

**Charakterisierung der anhand von NCAM-140 definierten
Tumorrandzone in humanen Glioblastomen mittels
Expressionsstudien für das endothelial gebundene CD 31 und den
Prototyp des Thrombinrezeptors PAR-1**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Brigitte Manuela Martin
geboren am 30.10.1980 in Meerane**

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Rolf Kalff, Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Bernhard Meyer, Klinik für Neurochirurgie, Technische
Universität München**
- 3. Prof. Dr. med. Volker Tronnier, Klinik für Neurochirurgie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. Dezember 2012

Abkürzungsverzeichnis

Ang	-	Angiopoetin
ATP	-	Adenosintriphosphat
BDNF	-	Brain-Derived Neutotrophic Factor
Ca ²⁺	-	Calciumion
°C	-	Grad Celsius
F3	-	Fibronectin Typ III
FGFR	-	Fibroblast Growth Factor Receptor
GDNF	-	Glial Cell line-derived Neutotrophic Factor
H/E	-	Hämatoxylin/Eosin
Ig	-	Immunoglobulin
IL	-	Interleukin
kb	-	Kilobase
kD	-	Kilodalton
L1	-	Zelladhäsionsmolekül L1
MG	-	Molekulargewicht
ml	-	Mililiter
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
MS	-	Multiple Sklerose
mRNA	-	Boten-RNA (messenger Ribonucleic Acid)
NCAM	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül (Neural cell adhesion molecule)
NCAM-120	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül Isoform 120
NCAM-140	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül Isoform 140
NCAM-180	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül Isoform 180
PAR	-	Protease aktivierter Rezeptor
PDGF	-	Paltelet-Derived Growth Factor
PDGF-BB	-	Paltelet-Derived Growth Factor-BB
PECAM-1/CD 31	-	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PSA	-	Polysialic Acid
RT-PCR	-	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sPECAM-1	-	soluble form of PECAM-1
TAG-1/axonin-1	-	Transiently expressed Axonal Glycoprotein-1
TF	-	Gewebefaktor (Tissue Factor)

TGF- β	-	Transforming Growth Factor- β
Tie	-	endothelspezifischer Tyrosinkinaserzeptor
Tie-1	-	endothelspezifischer Tyrosinkinaserzeptor-1
Tie-2	-	endothelspezifischer Tyrosinkinaserzeptor-2
TNF- α	-	Tumor Necrosis Factor- α
VEGF	-	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO-Grad	-	Einteilung gemäß World Health Organization
ZNS	-	Zentralnervensystem
μ l	-	Mikroliter
μ m	-	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	4
2.1 Gliome.....	4
2.2 Pathologische Neoangiogenese bei Gliomen.....	6
2.3 Das Neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM.....	8
2.3.1 Vorkommen, Struktur und Isoformen von NCAM.....	8
2.3.2 Bedeutung, Funktion und Besonderheit von NCAM.....	8
2.3.3 NCAM-Expression in Gliomen.....	9
2.3.4 Untersuchungsergebnisse der NCAM-140-Expression in Gliomen aus der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. S. A. Kuhn aus der Klinik für Neurochirurgie Jena.....	10
2.4 CD 31 (PECAM-1).....	10
2.4.1 Struktur und Vorkommen von CD 31.....	10
2.4.2 Funktion von CD 31.....	11
2.4.3 CD 31 und Angiogenese.....	12
2.5 Thrombin und PAR-1.....	12
2.5.1 Klassische Struktur und Funktion von Thrombin in der Gerinnungskaskade.....	12
2.5.2 Weitere Effekte und Vorkommen von Thrombin und seiner Rezeptoren.....	13
2.5.3 Funktion von Thrombin und des PAR-1-Rezeptors im Rahmen der Angiogenese und der pathologischen Gerinnung.....	15
3. Zielstellung.....	17
4. Material und Methode.....	18
4.1 Gewebeproben.....	18
4.2 Materialien.....	18
4.3 Geräte.....	19
4.4 Methoden.....	20
4.4.1 Herstellung der Pufferlösungen.....	20
4.4.2 Herstellung der Antikörperlösungen.....	20
4.4.3 Herstellung der Farb-Substrat-Lösung.....	21

4.4.4 Herstellung der Präparate.....	21
4.4.5 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die immunhistochemische Färbung.....	21
4.4.6 Durchführung der Immunhistochemie.....	22
4.4.7 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23
4.4.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23
4.5 Auswertungs- und Messmethode.....	24
4.5.1 Markierung der Grenze zwischen Tumorzone und Invasionszone bzw. grauer und weißer Substanz.....	24
4.5.2 Makroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression.....	24
4.5.3 Lichtmikroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression.....	25
4.5.4 Lichtmikroskopische Bewertung der PAR 1-Expression.....	26
4.5.5 Lichtmikroskopische Bewertung der CD 31-Expression.....	26
4.6 Durchführungsweise der Experimente und der Ergebnisbewertung.....	26
4.7 Statistische Auswertung.....	26
4.8 Fotografische Abbildungen.....	27
5. Ergebnisse.....	28
5.1 Expression von NCAM-140.....	28
5.1.1 Makroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression.....	28
5.1.1.1 NCAM-140 im Referenzgewebe.....	28
5.1.1.2 NCAM-140 im Tumorgewebe von Glioblastomen.....	29
5.1.1.3 NCAM-140-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe.....	30
5.1.2 Lichtmikroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression.....	32
5.1.2.1 NCAM-140 im Referenzgewebe.....	32
5.1.2.2 NCAM-140 im Tumorgewebe von Glioblastomen.....	34
5.1.2.3 NCAM-140-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe.....	35
5.1.3 Vergleich zwischen makroskopischer und lichtmikroskopischer Betrachtung.....	37
5.1.4 Abgrenzbarkeit zwischen Tumorzone und Invasionszone.....	38
5.1.5 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Analyse der NCAM-140-Expressionsdichte.....	42

5.2 Lichtmikroskopische Bewertung der Expression von CD 31.....	43
5.2.1 CD 31 im Referenzgewebe.....	43
5.2.2 CD 31 im Tumorgewebe von Glioblastomen.....	44
5.2.3 CD 31-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe.....	46
5.2.4 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Analyse der Expression von CD 31.....	48
5.3 Lichtmikroskopische Expression von PAR-1.....	48
5.3.1 Lichtmikroskopische Bewertung der PAR-1-Expression im Gewebe.....	49
5.3.1.1 PAR-1 im Referenzgewebe.....	49
5.3.1.2 PAR-1 im Tumorgewebe von Glioblastomen.....	50
5.3.1.3 PAR-1-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe.....	52
5.3.2 Lichtmikroskopische Bewertung der PAR-1-Expression in ein- und mehrschichtigen Gefäßen.....	54
5.3.2.1 PAR-1 in den Referenzproben.....	54
5.3.2.1.1 PAR-1-Expression der grauen Substanz.....	54
5.3.2.1.2 PAR-1-Expression der weißen Substanz.....	55
5.3.2.1.3 Vergleich zwischen der PAR-1-Expression grauer und weißer Substanz.....	57
5.3.2.2 PAR-1 in Glioblastomen.....	58
5.3.2.2.1 PAR-1-Expression der Tumorzone.....	58
5.3.2.2.2 PAR-1-Expression der Invasionszone.....	60
5.3.2.2.3 Vergleich zwischen der PAR-1-Expression der Tumor- und Invasionszone.....	62
5.3.2.3 PAR-1-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe.....	63
5.3.3 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Analyse der PAR-1-Expression.....	65
6. Diskussion.....	66
6.1 Einführung.....	66
6.2 Bewertung der verwendeten Methoden.....	67
6.2.1 Verwendung von Autopsiegewebe als tumorfreies Referenzgewebe.....	67
6.2.2 Bewertung der makroskopischen Analyse.....	67
6.2.3 Bewertung der lichtmikroskopischen Analyse.....	68

6.2.4 Bewertung der Differenzierung zwischen Tumor- und Invasionszone.....	69
6.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von NCAM-140.....	69
6.3.1 Ergebnisse der makroskopischen Auswertung der NCAM-140-Expressionsanalyse.....	69
6.3.2 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung der NCAM-140-Expressionsanalyse.....	70
6.3.3 Darstellung der Tumorgrenze.....	72
6.4 Ergebnisse der Expressionsanalyse von CD 31.....	73
6.5 Ergebnisse der Expressionsanalyse von PAR-1.....	75
6.6 Tumorbologische Bedeutung der untersuchten Antigene.....	77
6.7 Wirkung der untersuchten Antigene auf andere neuronale und pathophysiologische Prozesse.....	82
6.8 Therapeutische Ansätze und Ausblicke bei den untersuchten Antigenen.....	83
7. Schlussfolgerungen.....	86
8. Literaturverzeichnis.....	88
9. Anhang.....	100
9.1 Lebenslauf.....	100
9.2 Veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten.....	101
9.3 Danksagung.....	102
9.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	103

1. Zusammenfassung

Glioblastome sind Tumore, die vom neuroepithelialen Gewebe ausgehen und dem WHO-Grad IV entsprechen (Louis et al. 2007). Sie zeichnen sich durch eine geringe Zelldifferenzierung und eine 10-fach schnellere Wachstumsgeschwindigkeit als niedriggradigere Gliome aus (Swanson et al. 2003, Schlegel et al. 2003). Daher haben Glioblastome eine ausgesprochen ungünstige Prognose trotz der derzeitigen aggressiven Therapieformen, welche aus operativer Tumorentfernung, einer postoperativen Strahlentherapie und Chemotherapie bestehen. Diese haben insgesamt betrachtet eine limitierende Wirksamkeit. In den letzten 25 bis 30 Jahren hat es daher in Bezug auf die mittlere Überlebensrate nur wenige Verbesserungen gegeben (D'Abaco und Kaye 2007). Um neuartige Behandlungsstrategien zu entwickeln, ist es wichtig, die Tumorbilogie besser zu verstehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass, in Bezug auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen der vielfältigen Therapiemöglichkeiten und deren Interaktionen, die tumorbiologischen Eigenschaften der Tumorzone von Glioblastomen von denen der Invasionszone verschieden sind. Sie zeichnen sich durch zellulären Polymorphismus, Kernatypien, erhöhte pathologische Mitoserate, Thrombenbildung, Mikrogefäßproliferation und Nekrosen aus. Weiterhin haben sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur peripheren Tumorzellinvasion in das umliegende Hirngewebe (Kleihues und Cavenee 2000). Aus diesem Grund ist es schwierig, eine eindeutige Tumorgrenze zu erkennen. Dennoch lassen die verschiedenen tumorbiologischen Eigenschaften von Tumor- und Invasionszone aufgrund der unterschiedlichen molekularen Ausstattung in beiden Arealen eine Abgrenzung der Tumorzone zum peritumoralen Hirngewebe im Sinne der Invasionszone zu. Daher kann sich der Begriff einer scheinbaren Tumorgrenze etablieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsunterschiede von NCAM-140, CD 31 und PAR-1 in der Tumor- und Invasionszone von 56 humanen Glioblastomen untersucht und miteinander verglichen. Dabei wurde die Bewertung in Tumor- und Invasionszone getrennt voneinander vorgenommen. Weiterhin wurden diese Resultate den 20 Referenzproben der tumorfreien grauen und weißen Substanz des Hirngewebes gegenübergestellt. Die Expressionsanalyse erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung von mono- und polyklonalen Antikörpern. Die Farbintensität wurde im Zusammenhang mit dem Anteil an Antigen-positiven Zellen lichtmikroskopisch bewertet. Lediglich für NCAM-140 wurde eine zusätzliche makroskopische Auswertung vollzogen.

Die makroskopische wie auch die lichtmikroskopische Analyse von NCAM-140 ergab eine stufenweise Abnahme der NCAM-140-Expression von der grauen Substanz des Referenzgewebes ausgehend über die Invasionszone bis hin zur Tumorzone des Glioblastomgewebes. Die Tumorzone war in 99 % makroskopisch und zu 100 % lichtmikroskopisch durch eine negative oder sehr schwache NCAM-140-Expression gekennzeichnet. Der Verlust des NCAM-140 Adhäsionsmoleküls spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression und -invasion (Huang et al. 2001, Owens et al. 1998). Eine mögliche intraoperative Anwendung der NCAM-140-Immunreaktivität zur Detektion einer Tumorgrenze kann zumindest als eine grobe Orientierung bei der Unterscheidung von Tumorzone und Invasionszone dienen. Dabei ist es möglich, dass NCAM-140 als ein Markermolekül Einzug in die Wissenschaft findet.

In zahlreichen Studien konnte PAR-1 als ein entscheidender Faktor für invasives Wachstum im Rahmen der Tumorprogression identifiziert werden (Yin et al. 2003b, Fujimoto et al. 2010, Balzarotti et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit war die PAR-1-Expression in der Tumorzone signifikant höher als in der Invasionszone der Glioblastome und höher als in der grauen und weißen Substanz des Referenzgewebes. Insgesamt war in 77 % der Proben, eine sehr hohe bis hohe PAR-1-Immunreaktivität im Gewebe der Tumorzone zu verzeichnen. Es konnte hier eine stufenweise Abnahme der PAR-1-Expression von der Tumorzone der Glioblastome ausgehend über die Invasionszone und graue Substanz bis hin zur weißen Substanz der tumorfreien Vergleichsproben beobachtet werden. Auch bei der PAR-1-Expressionsanalyse von ein- und mehrschichtigen Gefäßen in den untersuchten Geweben waren gleiche Tendenzen, wie in der Bewertung von PAR-1 im entsprechenden umliegenden Gewebe zu verzeichnen. Die in der Tumorzone befindlichen Blutgefäße exprimierten den signifikant höchsten Anteil von PAR-1 in Bezug auf die ein- und mehrschichtigen Gefäße der Invasionszone beziehungsweise auf die graue und weiße Substanz der Referenzproben. Dies ist ein wichtiger Beleg dafür, dass PAR-1 an den Prozessen der Tumorangiogenese wesentlich beteiligt ist. Außerdem hat PAR-1 einen nachgewiesenen bedeutenden Anteil bei der Stabilisierung der neu rekrutierten Gefäße (Yin et al. 2003a).

Bei der Abschätzung des Ausmaßes der Tumorprogression kommt der Betrachtung der Neovaskularisation eine besondere Bedeutung zu (Folkman 1995, Rak et al. 1995). CD 31 ist ein endothelialer Zellmarker, der die Gefäße im lichtmikroskopischen Bild sichtbar macht. Es ist bereits bekannt, dass eine positive Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad von Gliomen und Gefäßdichte besteht. Somit ist in der Tumorzone von Glioblastomen, die höchste Dichte an Blutgefäßen mit der stärksten endothelialen Zellproliferation vorzufinden (Lebelt et al. 2008). In

der vorliegenden Arbeit konnte die signifikant höchste Gefäßdichte in der Tumorzone von Glioblastomen nachgewiesen werden. Die Invasionszone zeigt hingegen eine signifikant niedrigere Dichte von Blutgefäßen als die Tumorzone und interessanterweise auch als die graue Substanz der Referenzproben, jedoch eine weitaus höhere gegenüber der weißen Substanz des Referenzgewebes.

Letztlich konnte in dieser Arbeit dargelegt werden, dass die untersuchten Antigene mit der Abgrenzbarkeit der Tumorzone zum peritumoralen Hirngewebe assoziiert sind. Eine umfassende und endgültige Stellungnahme über ihre Rolle im Rahmen der Tumorprogression wird die Aufgabe weiterer Forschung sein. Überdies sollte geklärt werden, ob es weitere Unterscheidungsmerkmale zwischen Tumor- und Invasionszone gibt.

2. Einleitung

2.1 Gliome

Gliome gehören zu den primären Tumoren des ZNS (Greenberg 2006). Im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen sind primäre Tumoren im ZNS deutlich seltener. Dabei sind die primären Tumoren des Gehirns wesentlich häufiger als die primären Tumoren des Rückenmarks. Trotz jahrelanger Forschung und intensiver Bemühungen sind die Ursachen der primären Tumoren des Nervensystems nach wie vor weitgehend unbekannt (Schlegel et al. 2003, Moskopp und Wassmann 2005). Ebenso existieren keine typischen Frühsymptome, die die Entstehung von Hirntumoren erkennen lassen. Unspezifische Symptome, die auf einen Hirntumor hinweisen können, sind unter anderem Krampfanfälle, neurologische Herdsymptome, Wesensveränderungen, ein erhöhter Hirndruck und Kopfschmerzen (Masuhr und Neumann 2005). Die Klassifikation der Tumoren erfolgt nach den international anerkannten Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Dabei wird jeder Tumor neben der Artdiagnose mit einem Grad versehen. Hierbei gibt es vier WHO-Grade, die in Tabelle 1 näher erklärt sind (Schlegel et al. 2003, Moskopp und Wassmann 2005).

Tabelle 1: Darstellung der WHO-Grade mit ihren entsprechenden Eigenschaften

WHO-Grad I	langsames Tumorwachstum, keine atypischen Mitosen, keine Gefäßwandproliferationen und Nekrosen, geringe Zelldichte, sehr gute Prognose
WHO-Grad II	erhöhte Neigung zur Rezidivbildung, keine atypischen Mitosen, keine Gefäßwandproliferationen und Nekrosen, gering-mäßige Zelldichte
WHO-Grad III	zahlreiche und teilweise atypische Mitosen, mögliche Gefäßwandproliferationen, keine Nekrosen, erhebliche Zelldichte
WHO-Grad IV	sehr rasches Tumorwachstum, zahlreiche atypische Mitosen, erhebliche Gefäßwandproliferationen, ausgedehnte Nekrosen, hohe Zelldichte

Gliome machen über 50 % der intrakraniellen Tumoren aus (Lebelt et al. 2008). Anhand der morphologischen Ähnlichkeit der neoplastischen Zelle zu Gliazellen und der vermuteten Herkunft aus diesen unterscheidet man im Wesentlichen drei Typen: Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome (Tabelle 2). Weisen neoplastische Zellen oligodendrogliale und astrozytäre Histologien auf, so spricht man von Mischgliomen (Schlegel et al. 2003, Louis et al. 2007). Oligodendrogliale Tumoren haben insgesamt eine günstigere Prognose als astrozytäre Gliome (Feiden und Feiden 2008).

Tabelle 2: Einteilung der Gliome nach der WHO (Schlegel et al. 2003, Louis et al. 2007)

WHO-Grad	Astrozytom	Oligodendrogliom	Ependymom	Mischgliom
I	pilozytisch	-	myopapillär und Subependymom	-
II	diffus: fibrillär, proto-plasmatisch und gemistozytisch	diffus	diffus	diffus
III	anaplastisch	anaplastisch	anaplastisch	anaplastisch
IV	Glioblastoma multiforme	-	-	-

Die Astrozytome sind die größte Gruppe unter den Gliomen. Nach der WHO-Klassifikation werden vier astrozytäre Tumorggrade unterschieden (Tabelle 2). *Pilozytische Astrozytome* sind die häufigsten hirneigenen Tumoren des Kindes- und Jugendalters. Sie weisen ein langsames Tumorstadium auf. In seltenen Fällen können sie auch diffus infiltrativ wachsen. Nur in Ausnahmefällen zeigen sie eine maligne Progression (Schlegel et al. 2003). Sie stellen „biologisch“ gesehen eine eigene Gliomart dar (Feiden und Feiden 2008). *Diffuse Astrozytome* sind typisch für das junge Erwachsenenalter. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Sie sind langsam wachsende Tumoren. Diffuse Astrozytome haben die Tendenz zur malignen Progression (Schlegel et al. 2003, Kleihues und Cavenee 2000). *Anaplastische Astrozytome* sind die Tumoren des mittleren Lebensalters mit einem Häufigkeitsgipfel im 4. bis 5. Lebensjahrzehnt. Anaplastische Astrozytome, wie auch Glioblastome vom WHO-Grad IV, können sich als primäre Tumoren oder im Rahmen der malignen Progression entwickeln (Louis et al. 2007, Kleihues und Cavenee 2000). *Glioblastome* gehören in die Gruppe der Astrozytome und sind WHO-Grad IV-Tumoren. Sie machen 50 % der Gliome im Erwachsenenalter aus (Moskopp und Wassmann 2005). Die mittlere Überlebenszeit nach erfolgter adjuvanter und chirurgischer Standardtherapie betrug vor der Einführung von Temozolomid 50 Wochen (Kleihues und Cavenee 2000). Bei alleiniger chirurgischer Resektion sind es sogar nur 14 Wochen (Taveras et al. 1962). Das Glioblastom hat eine 10-fach schnellere Wachstumsgeschwindigkeit als Gliome mit niedrigerem Malignitätsgrad (Swanson et al. 2003). Sie entstehen häufig in den Großhirnhemisphären und in tiefer gelegenen Mittellinienstrukturen mit einer Bevorzugung myelinisierter Fasertrakte, wodurch sich die Tumoren als charakteristische Schmetterlingsgliome in beiden Hirnhemisphären ausbreiten können. Glioblastome können in jedem Lebensalter auftreten, allerdings gibt es einen Häufigkeitsgipfel im 6. Lebensjahrzehnt. Sie sind schnell wachsende, große und unscharf abgegrenzte Tumoren (Schlegel et al. 2003, Kleihues und Cavenee 2000). Charakteristisch im histologischen Bild ist

eine hohe Zelldichte sowie eine zelluläre und nukleäre Pleomorphie. Das Glioblastom zeigt eine hohe mitotische Aktivität mit vielen atypischen Mitosen. Weiterhin präsentiert es eine ausgeprägte GFAP-Immunreaktion und Nekrosen mit pathologischen mikrovaskulären Proliferationen (Louis et al. 2007). Diese bestehen aus zahlreichen, sich schnell teilenden Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen, welche in der Nachbarschaft von Nekrosen und an der Grenze zum Gehirngewebe besonders markant sind. Oftmals fallen glomeruloide konfigurierte oder girlandenartige Kapillarproliferationen auf (Brat und Van Meir 2004). Die WHO-Klassifikation unterscheidet zwei histologische Untergruppen, das Riesenzellglioblastom und das Gliosarkom (Schlegel et al. 2003, Kleihues und Cavenee 2000).

2.2 Pathologische Neoangiogenese bei Gliomen

Die Entwicklung von Gliomen und ihre Progression werden durch die Bildung eines tumoreigenen Blutgefäßsystems begleitet. Bei höhergradigen Gliomen zeigen sich prominente Mikrogefäßproliferationen (Kleihues und Cavenee 2000). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die höchste Mikrogefäßdichte bzw. -proliferation in Glioblastomen und die niedrigste in Oligodendrogliomen anzutreffen ist (Lebelt et al. 2008). Für das Tumorwachstum und die Metastasierung spielt die pathologische Angiogenese eine entscheidende Rolle. Dieser Zusammenhang wurde schon vor über 30 Jahren festgestellt. Man fand heraus, dass ein Tumor ohne Anschluss an ein neues Blutgefäßsystem nur bis zu einer Größe von 1-3 mm³ wachsen konnte, da die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport der Stoffwechselendprodukte allein durch die Diffusion nicht ausreichend war (Folkman 1971). Bei der Angiogenese bilden sich neue Blutgefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen (Carmeliet und Jain 2000). Dabei entstehen neue Endothelzellen nicht nur durch Proliferation und Migration, sondern auch aus im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen, die dem Knochenmark entstammen. Diese zirkulierenden Zellen können sich am Ort der Angiogenese festsetzen und die Gefäßneubildung unterstützen. Bei der Induktion der Angiogenese spielt die Zellhypoxie mit der Ausschüttung von Stickstoffmonoxid eine entscheidende Rolle. Dadurch werden eine Reihe von endothelialen Zellrezeptoren hoch reguliert, wie der Tie-1-, der Tie-2-, der PDGF-Rezeptor- β und Integrine wie $\alpha_v\beta_3$ (Abbildung 1) (Kleihues und Cavenee 2000, Dreys 2005). Aber auch die VEGF-Rezeptoren, an die VEGF als der wichtigste Regulator der Proliferation von Mikrogefäßen bindet, sind in einer höheren Dichte vertreten. Gewöhnlich werden diese Rezeptoren im ruhenden Endothelium nicht exprimiert. In gefäßproliferativen Tumoren hingegen schon, was letztendlich eine wichtige Rolle in der Tumورprogression spielt. Durch die Anwesenheit von VEGF ist eine erhöhte Gefäßpermeabilität vorhanden, was die Entstehung von

peritumorösen Ödemen bedingt (Kleihues und Cavenee 2000). Ebenfalls wird vermehrt Angiopoietin-2 (Ang-2) exprimiert, welches ein Inhibitor der Tie-2-Signaltransduktion und ein natürlicher Antagonist von Angiopoietin-1 (Ang-1) ist. Ang-2 antagonisiert die stabilisierende Wirkung von Ang-1 zwischen Endothelzellen und der Extrazellulärmatrix. Dies führt zu einer verstärkten Aussprossung von Endothelzellen und trägt dazu bei, dass sich glatte Muskelzellen von den Endothelzellen ablösen und die extrazelluläre Matrix durch Proteinasen (z. B. Matrixmetalloproteinasen, wie MMP-2 und MMP-9) aufgelöst wird (Kleihues und Cavenee 2000, Dreves 2005). Durch die Unterbrechung dieser physiologischen Barriere können sich die Endothelzellen aus dem Verband lösen, in die Matrix einsprossen und solide Stränge mit einem Lumen bilden. Die Gruppe der Ephrine, die ebenfalls vom Tumorgewebe exprimiert wird, unterstützt die Fusion mit existierenden Gefäßen sowie der einzelnen sprossenden Blutgefäße untereinander, damit sich ein funktionsfähiges Netzwerk von Blutgefäßen entwickeln kann. Die Reifung und Stabilisierung der neuen Blutgefäße wird durch die Ausbildung einer neuen Basalmembran und Anlagerung von Perizyten und glatten Muskelzellen abgeschlossen, die durch verschiedene Faktoren, wie z. B. Ang-1, Tie-2, PDGF-BB und TGF- β reguliert wird. Bei den Tumorgefäßen fehlen jedoch häufig die Perizyten, was zu einer fehlerhaften Integrität und Funktionalität der Gefäße führt (Dreves 2005, Arenberg und Strieter 1999).

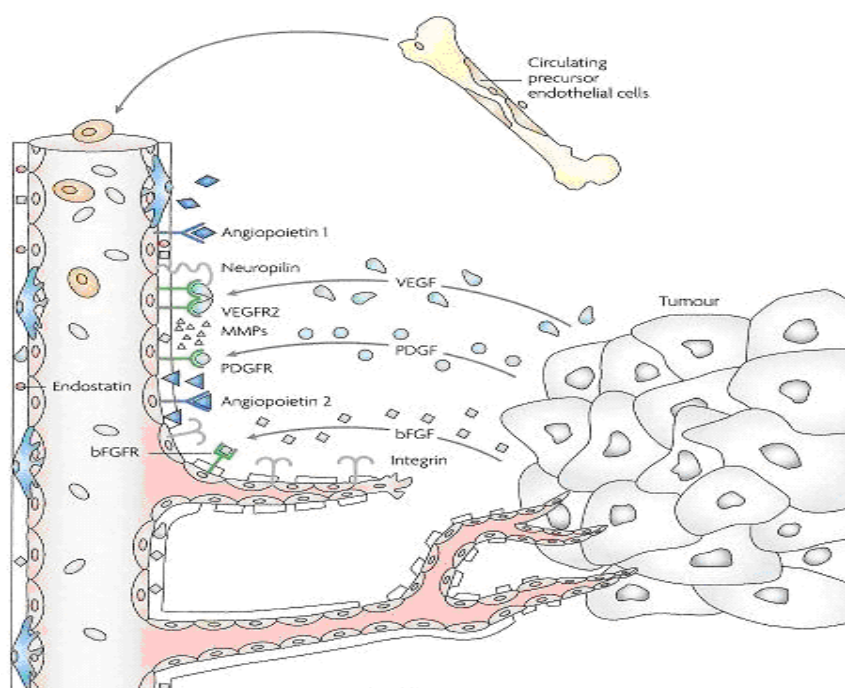


Abbildung 1: schematische Darstellung der Angiogenese (nach Folkman 2007)

2.3 Das Neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

2.3.1 Vorkommen, Struktur und Isoformen von NCAM

Das Neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist ein membranassoziertes Glykoprotein (Kiselyov et al. 2005), das vor allem auf der Oberfläche von Nervenzellen, aber auch auf Gliazellen und anderen Körperzellen exprimiert wird (Soroka et al. 2008, Ronn et al. 1998, Walmod et al. 2004). Es ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, zu der noch viele weitere Untergruppen von Zelladhäsionsmolekülen gehören (Crossin und Krushel 2000, Kiselyov et al. 2005). Als eines der ersten Ig-artigen Zelladhäsionsmoleküle wurde NCAM erstmals 1977 aus embryonalem Hühnergewebe isoliert (Thiery et al. 1977). Mehr als 30 verschiedene Isoformen sind seither entdeckt worden, die durch alternatives RNA-Spleißen entstehen können, wobei NCAM-180 (180 kD), NCAM-140 (140 kD) und NCAM 120 (120 kD) die bedeutendsten Formen sind (Cunningham et al. 1987, Owens et al. 1987). Alle drei Isoformen weisen in ihrem extrazellulären Anteil fünf Ig-ähnliche und zwei Fibronektin Typ-III (F3)-homologe Domänen auf (Cunningham et al. 1987). Am intrazellulären C-Terminus des Moleküls unterscheiden sie sich jedoch wesentlich, was das Molekulargewicht bestimmt und zur entsprechenden Namensgebung führt (Crossin und Krushel 2000). NCAM-180 und NCAM-140 stellen hierbei Transmembranproteine mit unterschiedlich langen zytoplasmatischen Anteilen dar. NCAM-120 ist durch ein Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol in der Plasmamembran verankert (Ronn et al. 1998, Soroka et al. 2008). Neben diesen existieren auch noch lösliche Formen im Gehirn, in der zerebrospinalen Flüssigkeit und im Plasma (Ronn et al. 1998).

2.3.2 Bedeutung, Funktion und Besonderheit von NCAM

Die Kommunikation zwischen den einzelnen Neuronen oder Gliazellen wird unter anderem durch NCAM vermittelt. Dabei kann es zur Ausbildung einer homophilen und einer heterophilen Verbindung kommen. Von einer heterophilen Interaktion ist dann die Rede, wenn ein NCAM-Molekül mit einem anderen Partner der extrazellulären Matrix interagiert (zum Beispiel FGFR, GDNF, L1, TAG-1/axonin-1, PDGF, BDNF, Glukokortikoidrezeptor, Heparin, verschiedene Proteoglykane und Kollagene, ATP) (Kiselyov et al. 2005, Walmod et al. 2004). Findet allerdings eine Interaktion zwischen zwei NCAM-Molekülen statt, so liegt eine homophile Verbindung vor. Für die Ausbildung einer homophilen Interaktion existieren verschiedenste Modelle. Da die Strukturen der ersten drei Immunglobulin-Domänen (Ig 1, Ig 2, Ig 3) und der zweiten F3-Domäne von NCAM in zahlreichen Studien genauestens untersucht und analysiert wurden, ist heute das zweidimensionale „compact-flat-zipper-Modell“ am gängigsten (Kiselyov et al. 2005). Dabei findet zunächst eine cis-Wechselwirkung zwischen zwei NCAM-Molekülen

an ein und derselben Zelloberfläche statt. Es kommt zur Bildung eines NCAM-Dimers, das wiederum mit dem NCAM-Dimer der gegenüberliegenden Zelloberfläche eine trans-Interaktion eingeht. Letztendlich findet dieser Prozess zwischen mehreren NCAM-Molekülen der ersten drei Ig-Domänen statt, sodass eine reißverschlussartig verzahnte Struktur entsteht (Soroka et al. 2003, Soroka et al. 2008). Dem NCAM-Molekül kommt nicht nur eine Bedeutung als Zelladhäsionsmolekül zu, sondern es nimmt auch auf Signaltransduktionsvorgänge Einfluss. Das führt zur Expressionsveränderung innerhalb eines Gens (Ronn et al. 1998, Crossin und Krushel 2000). Somit spielt NCAM eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems, bei der Synapsenbildung, bei Lernprozessen sowie bei der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses beim Erwachsenen (Kiselyov et al. 2005). Aber auch Vorgänge der Migration, Proliferation und Differenzierung von Neuronen und Gliazellen werden durch NCAM beeinflusst (Walmod et al. 2004, Crossin und Krushel 2000). In zahlreichen Studien konnte dabei gezeigt werden, dass NCAM die Proliferation von Astrozyten und von neuronalen Stammzellen hemmt, jedoch die Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen fördert (Sporns et al. 1995, Krushel et al. 1995, Krushel et al. 1998, Amoureux et al. 2000).

Ein besonderes Augenmerk ist auf die Glykolysierung am Ig 5 des NCAM-Moleküls, im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation zu legen. Dabei entsteht das sogenannte PSA-NCAM, welches bei einer trans-homophilen Interaktion die Zelladhäsionskräfte vermindert (Kiselyov et al. 2005). PSA-NCAM spielt eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Proliferation und Migration von Neuronen und Gliazellen. Aus diesem wichtigen Grund ist es während der embryonalen Entwicklung sehr stark vertreten und wird daher auch als embryonales NCAM bezeichnet (Ronn et al. 1998, Crossin und Krushel 2000). Der Anteil an PSA-NCAM sinkt von 30 g im embryonalen Gehirn auf 10 g pro 100 g NCAM-Protein im adulten Gehirn. Es ist dann vorwiegend noch in den Arealen des Gehirns anzutreffen, die durch eine erhöhte zelluläre Plastizität charakterisiert sind, wie zum Beispiel der Hippocampus oder der Bulbus olfactorius (Kiselyov et al. 2005, Ronn et al. 1998).

2.3.3 NCAM-Expression in Gliomen

In zahlreichen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass Gliome mit steigendem WHO-Grad eine verminderte NCAM-Expression aufweisen. Sasaki zeigte diesen Zusammenhang für die Isoformen NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 auf, wohingegen Todaro dies für NCAM-140 und NCAM-180 untersuchte (Sasaki et al. 1998, Todaro et al. 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der NCAM-140-Expression zu einer verstärkten Zellmotilität führt (Edvardsen et al. 1993, Prag et al. 2002). Ebenfalls ist der Nachweis erbracht

worden, dass bei herabgesetzter NCAM-140-Expression eine verstärkte Zellmigration und eine damit verbundene gesteigerte Invasion und Erhöhung der Wachstumsrate möglich ist (Edvardsen et al. 1994, Gratsa et al. 1997, Owens et al. 1998).

2.3.4 Untersuchungsergebnisse der NCAM-140-Expression in Gliomen aus der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. S.A. Kuhn aus der Klinik für Neurochirurgie Jena

In den drei vorangegangenen Arbeiten von Jana Koblitz (Diplomarbeit), Stefanie Maria Kellmann (Promotionsarbeit) und Pedro Dünisch (Promotionsarbeit) wurde die NCAM-140-Expression in Gliomen beziehungsweise in Glioblastomen untersucht.

In den Arbeiten von Jana Koblitz und Pedro Dünisch konnte ein reziproker Zusammenhang zwischen WHO-Grad der Gliome und der NCAM-140-Expressionsdichte gezeigt werden. Das bedeutet, dass mit steigendem WHO-Grad die NCAM-140-Expression abnimmt. Dabei untersuchte Jana Koblitz 37 Gliome, wovon 11 Glioblastome waren und Pedro Dünisch 95 Gliome mit 48 Proben von Glioblastomen. Bei beiden waren 80 % der untersuchten Glioblastome WHO-Grad IV NCAM-140-negativ. Stefanie Maria Kellmann analysierte hingegen 52 Glioblastome, wovon 85 % durch eine negative oder sehr schwache NCAM-140-Expression gekennzeichnet waren. Ebenfalls zeigten alle drei Arbeiten, dass in der tumorfreien grauen Substanz von Autopsiematerial die höchste NCAM-140-Expression zu sehen war. Außerdem konnte in den Arbeiten die NCAM-140-negative Tumorzone vom umliegenden peritumoralen NCAM-140-positiven Gewebe abgegrenzt werden. Dabei beobachtete Pedro Dünisch dieses Phänomen bei 25 der insgesamt 48 Glioblastome, Jana Koblitz bei 9 von 11 Glioblastomen WHO-Grad IV und Stefanie Maria Kellmann bei 41 der 52 Glioblastomproben. Darüber hinaus war es aufgrund der unterschiedlichen NCAM-140-Expression makroskopisch mit dem bloßen Auge möglich, eine „Tumorgrenze“ von NCAM-140-negativen Glioblastomen zum umgebenden peritumoralen Gewebe zu identifizieren (Koblitz 2004, Kellmann 2010, Dünisch 2009).

2.4 CD 31 (PECAM-1)

2.4.1 Struktur und Vorkommen von CD 31

Das Platelet Endothelial Cell Adhesions Molecule (PECAM-1) oder auch CD 31 genannt, ist ein 130 kD schweres, voluminöses Glykoprotein und Mitglied der Ig-Superfamilie (Newman 1997, Newman 1999). Es wird durch ein 75 kb großes Gen, das in 16 Exons mit 15 dazwischen liegenden Introns organisiert ist, verschlüsselt. Dieses befindet sich am Ende des langen Arms des Chromosoms 17 (Gumina et al. 1996, Kirschbaum et al. 1994). CD 31 kommt vor allem auf Zellen vor, die mit dem Gefäßsystem in Verbindung stehen, z. B. auf Monozyten, neutrophilen

Granulozyten, zirkulierenden Thrombozyten, endothelialen intrazellulären Verbindungen, B-Lymphozyten und CD8+-T-Lymphozyten (Newman 1999). Der extrazelluläre Anteil von CD 31 wird durch sechs Ig-ähnliche Domänen gebildet. An einem kurzen transmembranösen Teil schließt sich der strukturell und funktionell komplexe intrazelluläre Bereich an. Dieser intrazelluläre Teil kann durch posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung und Palmitoylierung oder durch alternatives Spleißen der mRNA so verändert werden, dass unterschiedliche CD 31-Isoformen mit verschiedenen adhäsiven Eigenschaften entstehen können (Newman 1997, Gong und Chatterjee 2003, Kalinowska und Losy 2006). Da CD 31 im zytoplasmatischen Teil über zwei tyrosinbasierte Immunrezeptoren mit hemmenden Motiv verfügt, wird es in die Untergruppe der Ig-ITIMs eingeordnet (Newman 1999).

Finden Spleißvorgänge im Exon 9 statt, in dem die Verschlüsselung des transmembranösen Teils liegt, entsteht eine lösliche Form des CD 31 (sPECAM-1) (Gong und Chatterjee 2003, Kalinowska und Losy 2006). Das Molekulargewicht von sPECAM-1 beträgt 110 kD. Erhöhte Werte von dieser löslichen Form des CD 31 sind vor allem bei Patienten feststellbar, die systemisch-entzündliche Prozesse wie Multiple Sklerose oder koronare und cerebrale ischämische Ereignisse sowie eine Herzinsuffizienz hatten. Die eigentliche physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung von sPECAM-1 bei solchen Vorgängen ist noch unerforscht (Gong und Chatterjee 2003). In älteren Studien konnte die Vermutung angestellt werden, dass eine Erhöhung von sPECAM-1 die transendotheliale Zellmigration von Neutrophilen, Monozyten und natürlichen Killerzellen *in vitro* blockiert und ebenso akute Entzündungsvorgänge *in vivo* hemmt (Liao et al. 1997, Liao et al. 1999).

2.4.2 Funktion von CD 31

CD 31 vermittelt über eine homophile Interaktion Adhäsionen zwischen angrenzenden endothelialen Zellen sowie zwischen endothelialen Zellen und Leukozyten. Diese transhomophile Verbindung wird durch die Ig-Domäne 1 des extrazellulären Teils vermittelt, die von bivalenten Kationen unabhängig ist (Gong und Chatterjee 2003, Woodfin et al. 2007). Zudem besitzt CD 31 auch die Möglichkeit, heterophile Bindungen zu PECAM-1-negativen Zellen aufzubauen. Solche heterophilen Liganden können das Integrin $\alpha_v\beta_3$, CD 38 oder CD 177 sein (Newman 1997, Gong und Chatterjee 2003, Sachs et al. 2007). Ob Glucosaminoglykane heterophile Bindungspartner von PECAM-1 sind, ist seit der Arbeit von Sun et al. im Jahr 1998 umstritten (Sun et al. 1998). Die heterophile Interaktion hingegen verlangt die Präsenz von bivalenten Kationen und wird durch die extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen 1-3 und 6 realisiert (Newman 1997, Kalinowska und Losy 2006, Sachs et al. 2007).

CD 31 spielt daher nicht nur als Zelladhäsionsmolekül eine entscheidende Rolle, sondern nimmt auch auf eine Vielzahl von biologischen und pathophysiologischen Prozessen Einfluss, so zum Beispiel auf die transendotheliale Zellmigration von Leukozyten im Rahmen von Entzündungsvorgängen, auf die Angiogenese, auf die Thrombose- und Arterioskleroseentstehung, auf die Zellapoptose und die Wundheilung (Newman 1999, Gong und Chatterjee 2003, Kalinowska und Losy 2006).

2.4.3 CD 31 und Angiogenese

In den Arbeiten von DeLisser et al. und Matsumura et al. war erstmalig demonstriert worden, dass CD 31 an den Geschehnissen der Angiogenese wesentlich beteiligt ist (DeLisser et al. 1997, Matsumura et al. 1997). In einer weiterführenden Studie von Zhou et al. 1999 konnte die Mitwirkung von CD 31 speziell bei der Tumorangiogenese erklärt werden. Aus den resultierenden Ergebnissen dieser Arbeit stellten Zhou et al. eine Hypothese auf, die den Mechanismus von CD 31 im angiogenetischen Prozess erläutern soll. Es wird davon ausgegangen, dass in ruhenden Gefäßen eine homophile Verbindung von CD 31 zwischen den endothelialen interzellulären Verbindungen vorliegt. Dabei wird ein Signal ausgesendet, welches die Endothelzellen von einer Zellmigration abhält. Ist jedoch ein angiogenetischer Stimulus mit entsprechenden Faktoren, zum Beispiel TNF- α oder VEGF vorhanden, so kann das zu einer Umverteilung der CD 31-Moleküle in den endothelialen interzellulären Verbindungen führen. Das bestimmt letztendlich den Verlust der inhibierenden Effekte auf die Migration und ermöglicht eine ungehinderte Endothelzellwanderung. In einer späten Phase der Angiogenese organisieren sich die Endothelzellen nun zu Gefäßtunneln um und eine CD 31/CD 31-Verbindung mit inhibierender Wirkung wird wieder hergestellt. Das stabilisiert im Resultat die endothelialen Zell-Zell-Verbindungen und fördert damit die Gefäßneubildung (Zhou et al. 1999). Daher kann CD 31 als früher und sensibler Marker bei der tumorinduzierten Angiogenese angesehen werden (Zhou et al. 1999, Aroca et al. 1999).

2.5 Thrombin und PAR-1

2.5.1 Klassische Struktur und Funktion von Thrombin in der Gerinnungskaskade

Thrombin wurde erstmalig 1892 von Alexander Schmidt in seinem Werk zur Blutlehre beschrieben (Schmidt 1892). Thrombin ist eine multifunktionelle Vitamin-K-abhängige Serinprotease und gehört der Familie der Trypsine an. Es ist ein Schlüsselenzym im Gerinnungssystem. Eine Aktivierung von Prothrombin (Faktor II mit einem Molekulargewicht von 72 kD) zu Thrombin (Faktor IIa mit einem Molekulargewicht von 38 kD) wird durch den

Prothrombinasekomplex, bestehend aus Faktor Xa, Faktor Va, Ca^{2+} und negativ geladenen Phospholipiden, realisiert (Mann 1999, Linnemann und Kühl 2007). Thrombin besteht aus einer leichten 49 Aminosäuren langen A-Kette und einer schweren katalytischen B-Kette, die aus 259 Aminosäurerückständen aufgebaut ist. Beide Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Sokolova und Reiser 2008). Thrombin darf nicht als einziges Enzym in der Gerinnungskaskade verstanden werden. Es repräsentiert ein zentrales Molekül im Rahmen der Hämostase, von dem vielfältige Effekte ausgehen. Endothelständig gebunden an Thrombomodulin vermittelt Thrombin beispielsweise die Aktivierung des Proteins C, eines wichtigen Inhibitors der Gerinnung. Im Rahmen der Gerinnung ist es für die Aktivierung der Faktoren V, VIII, XI, XIII und die katalytische Umsetzung des Fibrinogens in ein Fibrinmonomer/-polymer (Fibringerinnsel) verantwortlich (Linnemann und Kühl 2007, Sokolova und Reiser 2008).

2.5.2 Weitere Effekte und Vorkommen von Thrombin und seiner Rezeptoren

Thrombin übt noch weitere Effekte auf das Endothel aus. Hierunter wird die Freisetzung von Prostacyclinen, Interleukin-1, PDGF sowie eine mitogene Wirkung auf Endothelzellen beobachtet (Linnemann und Kühl 2007). Weiterhin wirkt es auf spezifische Zellrezeptoren aktivierend und nimmt damit Einfluss auf vielseitige Signaltransduktionsvorgänge (Sokolova und Reiser 2008). In den 1990er Jahren wurden vier Typen dieser **Protease-aktivierten-Rezeptoren** (=PAR) entdeckt und durch Coughlin erstmalig beschrieben (Coughlin 1994). PARs gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Thrombin übernimmt die enzymatische Abspaltung eines 37-59 Aminosäuren langen Stückes (je nach Rezeptor) am extrazellulären NH_2 -Ende von PAR-1, PAR-3 und PAR-4. Der neu entstandene N-Terminus, auch als „tethered ligand“ bezeichnet, bindet an einer extrazellulär befindlichen Schleife des gleichen Rezeptors. Dadurch erfolgt die Aktivierung des Rezeptors, indem eine G-Protein-gekoppelte intrazelluläre Signaltransduktion ausgelöst wird. Zunächst kommt es dabei zur Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgender Produktion von Inositoltriphosphat. Dies bedingt wiederum eine erhöhte Ausschüttung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern, was letztendlich zur Aktivierung der Proteinkinase C führt. PAR-2 wird als einziger dieser Rezeptoren nicht durch Thrombin aktiviert. Er erfährt seine Anregung durch die Faktor Xa und VIIa oder durch Trypsin (Hollenberg und Compton 2002, Sokolova und Reiser 2008, Okamoto et al. 2001, Wang et al. 2002b). Das Vorkommen und die physiologische Bedeutung der einzelnen Rezeptoren konnte bestimmt werden. In Abbildung 2 sind PAR-1, -3 und -4 aufgeführt, die durch Thrombin aktiviert werden. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, wie weitreichend die Funktion von Thrombin außerhalb der Gerinnungskaskade ist. Jedoch sind viele

dieser Zellreaktionen noch nicht vollständig verstanden und deshalb Bestandteil weiterer Forschungen (Hollenberg und Compton 2002).

PAR-1

<i>Gewebeverteilung:</i>	Gehirn, Herz, Magen, Kolon, Niere, Hoden
<i>zelluläre Expression:</i>	Thrombozyten, Endothelium, glatte Muskelzellen, Mastzellen, Leukozyten, Epithel des Gastrointestinaltraktes, Fibroblasten, Neurone, Gliazellen (vor allem Astrozyten)
<i>physiologische Eigenschaft:</i>	-Thrombozytenaktivierung -proentzündliche und neurodegenerative Wirkung -embryonale Entwicklung -Regulierung des Gefäßtonus -Glianarbenbildung nach Substanzverletzung -neuroprotektive Wirkung bei Ischämie im Gehirn (Thrombin liegt in niedriger Konzentration vor) -neuronaler Zelluntergang im Striatum (Thrombin liegt in hohen Konzentrationen vor)

PAR-3

<i>Gewebeverteilung:</i>	Herz, Niere, Thymus, Pankreas, Magen, Dünndarm, Lymphknoten, Trachea
<i>zelluläre Expression:</i>	glatte Muskelzellen, Thrombozyten
<i>physiologische Eigenschaft:</i>	-Cofaktor von PAR-4

PAR-4

<i>Gewebeverteilung:</i>	Gehirn, Lunge, Pankreas, Hoden, Plazenta, Uterus, Prostata, Dünndarm, Kolon, Nebenniere, Lymphknoten, Skelettmuskel, Schilddrüse
<i>zelluläre Expression:</i>	Thrombozyten, Megakaryozyten
<i>physiologische Eigenschaft:</i>	-Thrombozytenaktivierung -neurodegenerative Wirkung

Abbildung 2: Lokalisation und potenzielle Rolle von PAR-1, -3, -4 (Hollenberg und Compton 2002, Sokolova und Reiser 2008)

PAR-1 im Gehirn

Untersuchungen zu PAR-1 zeigten, dass es im späten embryonalen sowie im frühen postnatalen Nervensystem eher in geringer Konzentration vorkommt. Jedoch ist im adulten Gehirn die PAR-

1-Kumulation in ausgesprochen hohem Maße vertreten. Dabei ist eine besonders hohe Prävalenz von PAR-1 in der CA2- und CA3- pyramidalen Zellschicht des Hippocampus wahrzunehmen. Hingegen ist in anderen Gehirnregionen wie Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Striatum und Amygdala das PAR-1-Vorkommen eher geringer ausgebildet (Striggow et al. 2001).

2.5.3 Funktion von Thrombin und des PAR-1-Rezeptors im Rahmen der Angiogenese und der pathologischen Gerinnung

Durch die Zunahme der Zelldichte im Rahmen des Tumorwachstums kommt es auf der einen Seite zur Zunahme von metabolischen Stoffwechselendprodukten und auf der anderen Seite zur Gewebekompression. Diese Zustände führen zu einer hypoxischen Situation, wodurch es zur vermehrten Ausschüttung des Gewebefaktors, auch Tissue Faktor genannt, kommt. Der Tissue Faktor stellt einen Kofaktor für den Gerinnungsfaktor VII dar, der die Aktivierung von Faktor X und letztendlich die Umsetzung von Prothrombin zu Thrombin bedingt (Brat und Van Meir 2004, Rong et al. 2005, Moser 2008).

Durch den erhöhten resultierenden Thrombingehalt zum Beispiel im Rahmen der Hypoxie kommt es zu einer abnorm gesteigerten systemischen Gerinnung. Seit Beginn des 19. Jahrhunderts gibt es Beobachtungen, dass Patienten mit Tumorleiden ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse haben (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004). Es konnte gezeigt werden, dass bei 20-30 % der Patienten mit einem Glioblastom eine tiefe Beinvenenthrombose auftrat. Außerdem zeigte sich in 90 % der Fälle eine intravaskuläre Thrombenbildung innerhalb des Tumors (Rong et al. 2005). Somit kann ein Zusammenhang zwischen Malignität und pathologischer Koagulation gesehen werden (Brat und Van Meir 2004).

Neben der bedeutenden Beeinflussung der Blutgerinnung konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass Thrombin eine proangiogenetische Fähigkeit besitzt und damit ein wesentliches regulatorisches Element in der Blutgefäßentwicklung darstellt. Unter anderem ist es an der Aktivierung von den unter 2.2 beschriebenen Abläufen wesentlich beteiligt. Zum Beispiel werden VEGF mit seinen Rezeptoren, Angiopoietin-2 und Integrin $\alpha_v\beta_3$ durch Thrombin stimuliert. Hier spielt v. a. die Thrombin/PAR-1-Verbindung eine entscheidende Rolle (Moser und Patterson 2003, Moser 2008, Tsopanoglou und Maragoudakis 2007). Diese rezeptorvermittelte Eigenschaft von Thrombin im Rahmen der pathologischen Blutgefäßbildung wurde in zahlreichen Untersuchungen beleuchtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass PAR-1 in Tumorzellen und in Endothelzellen verstärkt exprimiert wird. Thrombin besitzt in Verbindung mit dem PAR-1-Rezeptor eine entscheidende stimulatorische Wirkung auf die Angiogenese. Damit verbunden ist letztendlich auch die Induktion des Tumorzellwachstums und dessen Metastasierung. Allerdings hat die kooperative Verbindung von Thrombin und PAR-1 auch auf

eine Vielzahl von physiologischen Vorgängen Einfluss, wie z. B. auf die Thrombozytenaktivierung, die Regulation des Gefäßtonus, die Barrierefunktion innerhalb des Gefäßsystems, die Beeinflussung von Entzündungsreaktionen und die Intimahyperplasie (Tsopanoglou et al. 1993, Tsopanoglou und Maragoudakis 2007).

3. Zielstellung

Aus vorangegangenen Untersuchungen von Frau PD Dr. med. S.A. Kuhn an Glioblastomen im Labor der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Jena war bekannt, dass eine Abgrenzung des Tumors zum peritumoralen Gewebe im Sinne einer Invasionszone anhand der NCAM-140-Expression getroffen werden konnte.

In dieser Arbeit bestand nun die Fragestellung bzw. die Aufgabe darin, herauszufinden, inwiefern eine scheinbare Tumorgrenze innerhalb der Glioblastome auf Basis der NCAM-140-Expression zwischen Tumorgewebe und peritumoralem Gewebe reproduzierbar war.

Hierzu wurden unter anderem Glioblastompräparate ausgewählt, die neben dem Tumorgewebe auch peritumorales Gewebe in Form einer Invasionszone aufwiesen.

Alle Präparate wurden makroskopisch und lichtmikroskopisch dahingehend beurteilt, wie hoch die NCAM-140-Immunreaktivität der Zellen von Tumorzone und Invasionszone tatsächlich war. Eine scheinbare Tumorgrenze sollte anhand dieser Kriterien aufgezeigt und charakterisiert werden.

Auf dieser Tatsache aufbauend konnte die Expression von PAR-1 in den einzelnen Gewebeanteilen lichtmikroskopisch beurteilt werden. Die erhaltenen Resultate wurden miteinander verglichen und es sollte untersucht werden, ob sich signifikante Unterschiede aufzeigten.

Neben dem Tumorgewebe wurde die PAR-1-Expression in den Endothelen von mehr- und einschichtigen Blutgefäßen entsprechend der „Zoneneinteilung“ lichtmikroskopisch beurteilt und verglichen.

Da man wusste, dass CD 31 ein biochemisches Markermolekül auf nicht-angiogenetischen und angiogenetischen Endothelzellen ist, konnte man sich damit alle Gefäßstrukturen in einem Hirnschnitt ansehen. Die Gefäßdichte in den entsprechend determinierten Zonen sollte ermittelt werden. Auch hier wurden die Ergebnisse miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Letztlich sollten die gewonnenen Ergebnisse in ihrer klinischen Nutzbarkeit analysiert bzw. diskutiert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Gewebeproben

In Tabelle 3 sind die verwendeten Gewebeproben aufgeführt.

Tabelle 3: verwendete Gewebeproben

untersuchte Gewebeproben	Anzahl	Herkunft
Glioblastome WHO-Grad IV	56	Operationsmaterial
tumorfremde Hirnproben	20	Autopsiematerial

Alle verwendeten Glioblastompräparate und Referenzproben entstammten dem Archiv des Institutes für Pathologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena und wurden im Zeitraum zwischen 1996 bis 2005 aus Operationen oder aus Autopsien gewonnen. Es wurden konsekutive Tumorproben eingeschlossen.

Von den 56 Proben des Glioblastoms WHO-Grad IV wiesen 28 Schnitte eine alleinige Tumorzone auf. Die anderen 28 Präparate zeigten neben der Tumorzone eine Invasionszone im Sinne des peritumoralen Gewebes.

Die 20 Proben des Referenzgewebes beinhalteten eine graue und weiße Substanz des Telencephalons.

Ein Antrag zur Untersuchung dieser anonymisierten Gewebe wurde bei der lokalen Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität gestellt und bewilligt.

4.2 Materialien

In Tabelle 4 sind alle verwendeten Materialien für die immunhistochemische Untersuchung aufgeführt.

Tabelle 4: verwendete Materialien für die immunhistochemische Untersuchung

Materialienname	Firma	Herkunftsort
Verbrauchsmaterialien		
Super Frost® Plus Objektträger, gebrauchsfertig	Menzel-Gläser	Braunschweig, Deutschland
Polysine® Objektträger, gebrauchsfertig		
Deckgläser 24x60mm bzw. 24x32mm	Menzel-Gläser	Braunschweig, Deutschland
Bearbeitungsklingen für Mikrotom	FEATHER® Safety Razor Co., Ltd.	Osaka, Japan
Pinsel	Pelikan®	Hannover, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Fixier- und Einbettmittel		
Formaldehyd	Carl Roth GmbH&Co	Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH&Co	Karlsruhe, Deutschland
Lösungsmittel und Puffersubstanzen		
Aceton rein, Xylol rein, Ethanol (50-, 60-, 96-%)	Carl Roth GmbH&Co	Karlsruhe, Deutschland
TRIZMA Base	SIGMA-Aldrich	Steinheim, Deutschland
TRIZMA Hydrochlorid	Chemie GmbH	
NaCl	E. Merck	Darmstadt, Deutschland
TWEEN 20	SIGMA-Aldrich	Steinheim, Deutschland
	Chemie GmbH	
spezielle Chemikalien und Färbelösungen für Immunhistochemie		
ChemMate™ Detection Kit		Glostup, Dänemark
-biotinylierter Sekundärantikörper	Dako Cytomation	
-Streptavidin-Alkalische Phosphatase		
-Chromogen Rot 1 (x28)		
-Chromogen Rot 2 (x28)		
-Chromogen Rot 3 (x28)		
-AB-Substrat Puffer		
-Levamisol (x501)		
Antikörperversüßungslösung	Zymed	San Francisco, USA
Pronase E von Streptomyces griseus	SERVA	Heidelberg, Deutschland
Eosin Y Lösung, alkoholische	SIGMA-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung	Chemie GmbH	
verwendete Antikörper		
Maus Anti-Human-CD 31 monoklonaler Primärantikörper	Dako Cytomation	Glostrup, Dänemark
Maus Anti-Human-PAR-1 monoklonaler Primärantikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Santa Cruz, USA
Kaninchen Anti-Human-NCAM-140 polyklonaler Primärantikörper	Chemicon International	Temecula, USA
Eindeckmittel		
Schnelleindeckmittel für histologische und cytologische Präparate	Pertex medite	Burgdorf, Deutschland
Glycerol-Gelatine (für Mikrokopie), gebrauchsfertig	SERVA	Heidelberg, Deutschland

4.3 Geräte

In Tabelle 5 sind alle verwendeten Geräte für die immunhistochemische Untersuchung aufgeführt.

Tabelle 5: verwendete Geräte für die immunhistochemische Untersuchung

Gerät	Firma	Herkunftsort
Mikrotom HM 335 E	Microm GmbH	Walldorf, Deutschland
Wasserbad Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
Hitzschrank Typ 54010	Medax Nagel GmbH	Kiel, Deutschland
Inkubator Kelvitron t	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Zentrifuge „5415“ C	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2™	Scientific Industries	Bohema, USA
Analysenwaage	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
1000µl, 200µl, 10µl, 2-20µl Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Reinwasseranlage „PURELAB maxima“	ELGA Lab Water	Ransbach-Baumbach, Deutschland
Rotilabo®-Färbekammer	Carl Roth GmbH&Co	Karlsruhe, Deutschland
Färbekasten aus Glas	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Glasschale	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Messzylinder 2l	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Lichtmikroskop DME	Leica Microsystems Ltd.	Buffalo, N.Y., USA
Kamera DFC 290	Leica Microsystems Ltd.	Buffalo, N.Y., USA

4.4 Methoden

4.4.1 Herstellung der Pufferlösungen

TRIS-Puffer (Spülpuffer) mit TWEEN 20

Es wurden 2,3 g TRIS-Base, 17,13 g TRIS-Hydrochlorid, 22 g NaCl in 2,5 l zweifach destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 2 ml TWEEN 20 zugegeben und vermischt.

TRIS-Puffer (Spülpuffer) ohne TWEEN 20

Es wurden 0,9 g TRIS-Base, 6,85 g TRIS-Hydrochlorid, 8,78 g NaCl in 1 l zweifach destillierten Wasser gelöst und vermischt.

4.4.2 Herstellung der Antikörperlösungen

NCAM-Antikörper-Lösung

Der polyklonale Primärantikörper gegen humanes NCAM-140 wurde im Verhältnis von 1:1000 mit einer aus Kälberserum bestehenden Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Die Antikörperverdünnungslösung diente der Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen.

CD 31-Antikörper-Lösung

Der hier verwendete monoklonale Primärantikörper gegen humane CD 31-Endotheladhäsionsmoleküle wurde im Verhältnis von 1:200 mit der Antikörperverdünnungslösung verdünnt.

PAR-1-Antikörper-Lösung

Der monoklonale Primärantikörper gegen den humanen Thrombinrezeptor PAR-1 wurde im Verhältnis von 1:250 mit der Antikörperverdünnungslösung verdünnt.

4.4.3 Herstellung der Farb-Substrat-Lösung

Die Herstellung der benötigten Menge der Farb-Substrat-Lösung erfolgte entsprechend der Anzahl der zu färbenden Präparate. Die Bestandteile für die Farb-Substrat-Lösung entstammten vom ChemMate™ Detection Kit. Es wurden 1 ml AP-Substrat Puffer, 40 µl Chromogen Red1, 40 µl Chromogen Red 2, 40 µl Chromogen Red 3 und 2 µl Levamisol, was der Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase diente, miteinander vermischt. Jeweils 200 µl wurden auf den Objektträger gegeben.

4.4.4 Herstellung der Präparate

Das Gewebe der Glioblastome WHO-Grad IV sowie der tumorfreien Hirnproben aus Autopsiematerial wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur in 6 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Das diente zum einen dem Erhalt der Gewebemorphologie und zum anderen der Konservierung, was vor Autolyse und mikrobieller Zersetzung schützt. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin. Die Fixierung und die Einbettung wurden vom Institut für Pathologie in Jena durchgeführt. Von den Paraffinblöcken wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte gewonnen und in einem Wasserbad aufgefangen. Anschließend wurden die Schnitte in ein 55 °C heißes Wärmebad überführt. Das Wärmebad diente der Glättung des Schnittes, wonach der Schnitt auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen wurde. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Trocknung bei 37 °C im Inkubator. Um eine optimale Haftung der Schnitte auf dem Objektträger zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation für 30 min bei 60 °C in einem Hitzeschrank.

4.4.5 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die immunhistochemische Färbung

Zunächst wurden die Schnitte für 20 min in reines Xylol gegeben, was dem Herauslösen des Paraffins diente. Anschließend durchliefen die Schnitte eine Xylol-Aceton-Reihe, wodurch das

Xylol ausgespült wurde und die Schnitte in ein wässriges Milieu überführt wurden. Diese Reihe bestand aus zwei Einheiten reinem Xylol, fünf Einheiten reinem Aceton, eine Einheit Aceton-Leitungswasser-Gemisch 2/3-1/3 und eine Einheit Aceton-Leitungswasser-Gemisch 1/3-2/3. Danach wurden die Schnitte unter laufendem Leitungswasser 10x gründlich gespült. Im Anschluss daran wurden die Schnitte in einem TRIS-Puffer mit TWEEN 20 gegeben und für 20 min aquilibriert. Daran schlossen sich weitere Schritte für die spezifischen Färbungen an.

4.4.6 Durchführung der Immunhistochemie

NCAM-Färbung und PAR-1-Färbung

Die Objektträger mit den feuchten Schnitten wurden in die Färbekammer gelegt, mit je 200 µl der NCAM-Antikörper-Lösung bzw. PAR-1-Antikörper-Lösung benetzt und bei 4 °C für 20 Stunden inkubiert.

Danach wurden die Schnitte in TRIS-Puffer mit TWEEN 20 gewaschen und für 20 min aquilibriert. In der Folge wurden die Schnitte in die Färbekammern gegeben und zügig mit 3 Tropfen biotinyliertem Sekundärantikörper beträufelt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloss sich ein 10-minütiger Waschgang im TWEEN 20-haltigem TRIS-Puffer an, was der Entfernung von nicht gebundenen Sekundärantikörpern diente. Wiederum wurden die Objektträger mit den Schnitten in die Färbekammern zurückgelegt und mit je 3 Tropfen Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Lösung betropft und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich erfolgte wieder eine 10 min dauernde Waschung im TRIS-Puffer mit anschließender Überführung der Schnitte in die Färbekammern. Jetzt wurden 200 µl Farb-Substrat-Lösung pro Objektträger dazu gegeben. Die Reaktion wurde nach 7 min durch eine Spülung mit TWEEN 20-haltigem TRIS-Puffer gestoppt. Anschließend erfolgte eine gründliche Waschung mit Leitungswasser mit einer 1-minütigen Inkubationszeit. Nachdem die Schnitte mit zweifach destilliertem Wasser gespült wurden, wurden sie durch eine 1,5 min dauernde Inkubation mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Hämatoxylin ist positiv geladen und bindet damit an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren, was im Resultat die Zellkerne blau färbte. Die eigentliche tiefblaue Färbung entstand durch eine nachfolgende Spülung mit zweifach destilliertem Wasser und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit warmem Leitungswasser. Danach wurden die Schnitte mit Glycerol-Gelatine eingedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

CD 31-Färbung

Die im TRIS-Puffer befindlichen Objektträger wurden bei 45 °C in einem Wärmeschrank für 30 min inkubiert. Zeitgleich wurde der TRIS-Puffer ohne TWEEN 20 für 30 min bei 37 °C erwärmt. Nach der Erwärmung vom TRIS-Puffer ohne TWEEN 20 wurde pro 100 ml Puffer 0,05 g Pronase E dazugegeben. Dieses Gemisch wurde nun über die Schnitte verteilt und bei 38 °C für 12 min im Hitzeschrank inkubiert. Eine sich anschließende Spülung mit Wasser schloss den Pronase-Verdau ab. Danach erfolgte die Spülung mit TWEEN 20-haltigem TRIS-Puffer mit 10-minütiger Inkubation. Im Anschluss wurden die Schnitte in die horizontalen Färbekammern gelegt und 200 µl CD 31-Antikörper-Lösung pro Objektträger gleichmäßig aufgetragen. Auch hier erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 20 Stunden. Nachfolgend wurde mit dem biotinylierten Antikörper und der Farb-Substrat-Lösung wie oben beschrieben verfahren.

4.4.7 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst für 20 min in Xylol gegeben. Um sie zu rehydrieren, wurden sie in eine absteigende Ethanolreihe überführt, welche zu je einer Einheit aus absolutem 96 %-igem, 70 %-igem und 50 %-igem Ethanol bestand. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Leitungswasser und zweimal mit zweifach destilliertem Wasser.

4.4.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nachdem die unter 4.4.7 notwendigen Schritte erfolgten, wurde den Schnitten Hämatoxylin zugegeben. Nach 7 min wurden die Präparate mit zweifach destilliertem Wasser gespült und für 10 min im lauwarmen Leitungswasser inkubiert. Nach einer sich anschließenden Spülung mit zweifach destilliertem Wasser wurde Eosin auf die Schnitte gegeben. Wenn die 2 min andauernde Einwirkzeit verstrichen war, wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus einer Einheit 70 %-igem, drei Einheiten 96 %-igem und zwei Einheiten 100-igem Alkohol und abschließend mit zwei Einheiten Xylol gespült. Danach wurden die Schnitte mit xylolhaltigem Eindeckmittel eingedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

4.5 Auswertung- und Messmethode

4.5.1 Markierung der Grenze zwischen Tumorzone und Invasionszone beziehungsweise grauer und weißer Substanz

OA Dr. med. M. Brodhun (Institut für Pathologie, Helios Klinikum Erfurt) markierte in den H/E-gefärbten Schnitten des Tumorgewebes die Bereiche des Tumors und der Invasion bzw. im Referenzgewebe die graue und weiße Substanz. Diese markierten Bereiche wurden auf die jeweils zugehörigen NCAM-140, CD 31 und PAR-1 gefärbten Präparate makroskopisch übertragen. Es ist zwar allgemein bekannt, dass aufgrund des diffusen Wachstums bei Glioblastomen keine tatsächliche Grenze im Tumor existiert, dennoch wird in dieser Arbeit im weiteren Verlauf von einer „scheinbaren“ Tumorgrenze zwischen Tumorzone und Invasionszone gesprochen.

4.5.2 Makroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression

Die unter 4.4.6 hergestellten NCAM-Präparate wurden bei der makroskopischen Analyse mit dem bloßen Auge betrachtet. Das Analyseverfahren erfolgte in Anlehnung an das in der Arbeit von Duenisch et al. Dabei wurden die wahrnehmbaren Intensitäten der NCAM-140-Färbung im tumorhaltigen Gewebe und in den Referenzproben beurteilt. Um ein Maß für die Stärke der NCAM-Immunreaktion zu erhalten, erfolgte eine Einteilung von negativer NCAM-Expression über eine schwache, moderate bis starke NCAM-Expression. Diese Werte wurden mit dem prozentualen Flächenanteil (5 Gruppen: 1-25 %, 26-50 %, 51-75 %, 76-99 % oder 100 %) der jeweiligen Stärke multipliziert (Tabelle 6). Lagen verschiedene Farbtintensitäten in dem zu bewertenden Präparat vor, so wurde diese Produktbildung für alle Farbtintensitäten entsprechend wiederholt und zu einem Gesamtwert summiert (Duenisch et al. 2011).

Tabelle 6: Schematische Darstellung der Intensitäten mit entsprechendem Mittelwert des prozentualen Anteils an der zu betrachtenden Gesamtfläche

Intensität der NCAM-140-Immunfärbung	Zahlenwert	prozentualer Anteil der NCAM-140-positiven Zellen pro Gesichtsfeld	Mittelwert in %
Negativ	0	0	0
Schwach	1	1-25	13
Moderat	2	26-50	38
Stark	3	51-75	63
		76-99	87,5
		100	100

4.5.3 Lichtmikroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression

In jedem Präparat wurden 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder in den unter 4.5.1 festgelegten Zonen bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgewertet. Die Bewertung erfolgte analog der bei der makroskopischen Analyse veranschaulichten Methode (Duenisch et al. 2011). Dabei lag eine negative NCAM-Expression vor, wenn die Tumorzellen keine Rotfärbung zeigten. Eine stark intensive NCAM-Immunfärbung lag vor, wenn die Zellen eine vollständige Rotfärbung aufwiesen. Die Kategorien schwach und moderat stellten Übergänge in der Intensitätssteigerung der NCAM-Expression dar (Abbildung 3). Lagen in einem Gesichtsfeld unterschiedliche Farbintensitäten vor, wurden diese mit dem entsprechenden prozentualen Anteil einzeln beurteilt und zu einem Gesamtwert, für das entsprechende Gesichtsfeld, summiert.

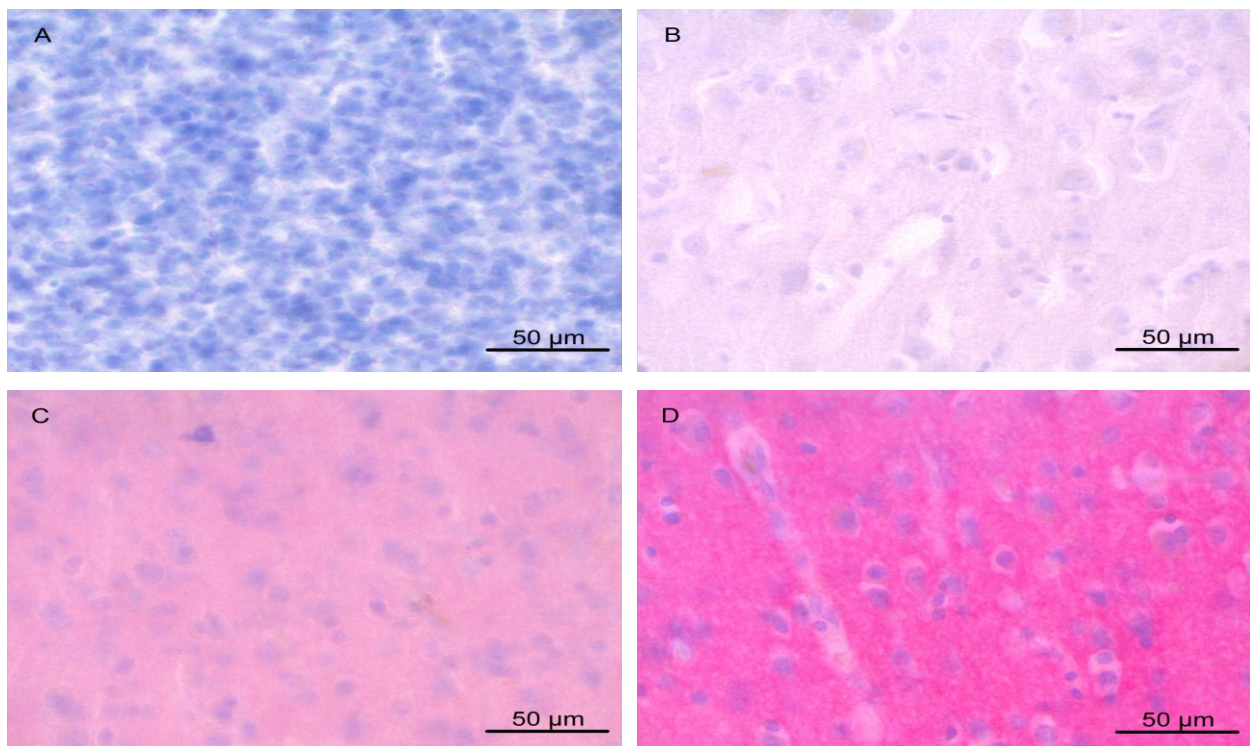


Abbildung 3: Darstellung der einzelnen NCAM-140 Färbeintensitäten mit prozentualen Anteil pro Gesichtsfeld

A = keine/negative Färbung der Tumorzone bei Färbeintensität 0 mit 100 % der Zellen pro Gesichtsfeld → Zahlenwert: 0

B = schwache Färbung der weißen Substanz bei Färbeintensität 1 mit 100 % der Zellen pro Gesichtsfeld → Zahlenwert: 100

C = moderate Färbung der Invasionszone bei Färbeintensität 2 mit 100 % der Zellen pro Gesichtsfeld → Zahlenwert: 200

D = starke Färbung der grauen Substanz bei Färbeintensität 3 mit 100 % der Zellen pro Gesichtsfeld → Zahlenwert: 300

Weiterhin wurde in den für NCAM-140 gefärbten Tumorproben der Übergang zwischen Tumorzone und Invasionszone betrachtet und beurteilt. Dabei wurde bestimmt, ob eine diffuse Einzelzellinvasion, eine diffuse Invasion von Tumorzellnestern, eine scharfe Grenze oder eine Übergangsform zu beobachten war.

4.5.4 Lichtmikroskopische Bewertung der PAR-1-Expression

Auch hier wurden in den für PAR-1 gefärbten Schnitten 10 zufällige Gesichtsfelder ausgewählt und bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Bei der Bestimmung der PAR-1-Expression wurde wie unter 4.5.2 beschrieben verfahren. Es wurde die maximal sichtbare Farbintensität in einem Gesichtsfeld mit einem Zahlenwert als negativ, schwach, moderat oder stark gefärbt bewertet (Tabelle 6). Der Zahlenwert wurde mit dem prozentualen Anteil an der Gesamtfläche, der zu beurteilenden Zellen innerhalb des Gesichtsfeldes multipliziert. Lagen weitere Farbintensitäten im untersuchten Gesichtsfeld vor, so wurde der Vorgang für diese analog durchgeführt und eine Gesamtsumme für das Gesichtsfeld gebildet. Zusätzlich wurde das Endothel von einschichtigen und mehrschichtigen Gefäßen innerhalb des Gesichtsfeldes betrachtet. Auch hier wurde einer bestimmten Farbintensität ein prozentualer Anteil zugeordnet und analog dem Auswertungsschema aus Tabelle 6 verfahren. Somit wurde auch hier das Verfahren von Duenisch et al. analog angewendet (Duenisch et al. 2011).

4.5.5 Lichtmikroskopische Bewertung der CD 31-Expression

Bei einer 400-fachen Vergrößerung wurde die Anzahl der mit dem CD 31-Antikörper angefärbten Gefäße in den determinierten Arealen direkt ausgezählt. Auch hier wurden 10 zufällige Gesichtsfelder ausgewählt. Jedes Sichtfeld wurde dreimal ausgezählt und ein arithmetisches Mittel gebildet.

4.6 Durchführung der Experimente und der Ergebnisbewertung

Jede Färbung wurde doppelt ausgeführt. Die makro- und mikroskopische Auswertung erfolgte durch zwei voneinander unabhängige Untersucher.

4.7 Statistische Auswertung

Die lichtmikroskopischen und makroskopischen Messwerte wurden mit dem SPSS-Programm Version 15.0 für Windows erfasst. In der deskriptiven Statistik wurde aus allen Daten ein Mittelwert mit einfacher Standardabweichung für jede zu betrachtende Gruppe gebildet. Die einzelnen Werte zeigten keine Normalverteilung. Daher erfolgte die grafische

Veranschaulichung in Boxblots. Im Gegensatz zu Balkendiagrammen wird hier nicht der Mittelwert dargestellt, sondern der Median und die Verteilung der Werte.

Weiterhin wurde aus diesem Grund bei der Signifikanzbetrachtung der Antigenexpression zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe der Mann-Whitney-Test mit einer Mindestanforderung von $p < 0,05$ angewendet. Bei diesem Test werden die miteinander verglichenen Gruppen voneinander unabhängig betrachtet. Erfolgte die Betrachtung der Antigenexpression hingegen direkt zwischen Invasionszone und Tumorzone beziehungsweise zwischen grauer Substanz und weißer Substanz wurde die Signifikanzprüfung mit einer Mindestanforderung von $p < 0,05$ anhand des Wilcoxon-Tests durchgeführt. Da hier die Gruppen in Abhängigkeit voneinander direkt miteinander verglichen wurden, erfolgte die grafische Darstellung in einem Boxplot, in dem die Differenzen der verglichenen Werte aller Proben abgebildet sind.

Wie bei NCAM-140 und PAR-1 unter 4.5.2, 4.5.3 und 4.5.4 beschrieben wurde pro Präparat in jedem der 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfelder ein Produkt aus Farbtintensität und jeweiligem prozentualen Anteil gebildet. Anschließend wurde aus den 10 Werten für jede Referenz- und Tumorprobe ein Mittelwert berechnet, welcher im weiteren Verlauf als Expressionsdichte bezeichnet wurde. Dieser konnte zwischen 0 (antigennegativ) und 300 (antigenpositiv) liegen. In dieser vorliegenden Arbeit wurde ein Wert 0 als negativ, ein Wert bis < 60 als „niedrig“, ein Wert ≥ 60 und < 120 als „mittel“, ein Wert zwischen ≥ 120 und < 180 als „hoch“ und ein Wert ≥ 180 als „sehr hoch“ eingestuft.

Anhand des Chi-Quadrat-Tests wurde in den NCAM-140 gefärbten Präparaten die Häufigkeit verschiedener Ausprägungen einer Tumorgrenze auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

Auch bei der CD 31-Expression wurde aus den 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ein Mittelwert für die Gefäßdichte in der jeweiligen Tumor- und Referenzprobe gebildet. Dabei lag eine „geringe“ Gefäßdichte vor, wenn der Wert $< 3,5$ betrug. Hingegen war eine „mittlere“ Gefäßdichte bei Werten zwischen $\geq 3,5$ und < 5 , eine „hohe“ bei einem Wert von ≥ 5 bis $< 6,5$ und eine „sehr hohe“ bei Werten $\geq 6,5$ vorhanden.

4.8 Fotografische Abbildungen

Es wurden in den verschiedenen Gewebeanteilen der unterschiedlichen Färbungen repräsentative Bereiche ausgewählt und fotografisch dargestellt. Die Zuordnung der Messbalken in den fotografischen Abbildungen erfolgte mit dem Programm Leica Application Suite 3.0.0.

5. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit bestand die Fragestellung darin, ob ein Expressionsunterschied von NCAM-140 und PAR-1 sowie ein Unterschied in der Gefäßdichte (CD 31-Expression) zwischen Invasionszone und Tumorzone beziehungsweise zwischen grauer und weißer Substanz auszumachen ist. Weiterhin sollte anhand dieser Betrachtung herausgefunden werden, ob eine scheinbare „Tumorgrenze“ definiert werden kann. Bei den mit CD 31 gefärbten Schnitten erfolgte eine direkte Auszählung der einzelnen Gefäße. Hingegen wurde bei den mit NCAM und PAR-1 gefärbten Schnitten eine Expressionsdichte ermittelt, was ein Produkt aus Intensität und prozentualem Anteil an der Gesamtfläche der Färbung darstellte.

5.1 Expression von NCAM-140

5.1.1 Makroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression

5.1.1.1 NCAM-140 im Referenzgewebe

Die graue Substanz des tumorfreien Referenzgewebes zeigte bei makroskopischer Betrachtung in allen 20 Proben eine „sehr hohe“ Expressionsdichte. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in die graue Substanz betrug $287,98 \pm 20,16$ (Tabelle 7).

Die tumorfreie weiße Substanz des Referenzgewebes zeichnete sich dagegen in 60 % der Fälle mit einer „niedrigen“ NCAM-140-Expressionsdichte aus. Bei acht der insgesamt 20 Proben lag die Expressionsdichte im „mittleren“ Bereich. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in der weißen Substanz betrug $55,06 \pm 19,53$ (Tabelle 7).

Unter Zuhilfenahme des Wilcoxon-Tests konnte gezeigt werden, dass die graue Substanz bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere NCAM-140-Expression aufwies als die weiße Substanz (Tabelle 8). Die Abbildung 4 veranschaulicht dieses Ergebnis.

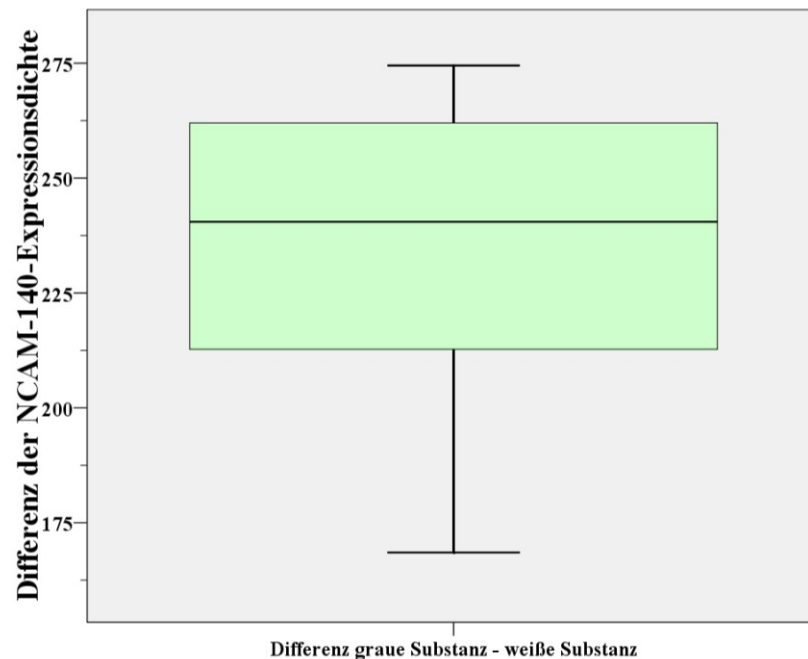


Abbildung 4: Differenzen der makroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte von grauer Substanz und weißer Substanz bei ein und derselben Referenzprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere NCAM-140-Expression der grauen Substanz gegenüber der weißen Substanz verdeutlicht.

5.1.1.2 NCAM-140 im Tumorgewebe von Glioblastomen

Bei der makroskopischen Analyse der Tumorzone von den untersuchten 56 Glioblastomen zeigte sich in 22 der Fälle keine NCAM-140-Färbung. Diese Präparate waren damit für die Tumorzone vollständig NCAM-140-negativ. Hingegen wiesen 34 der Glioblastomproben makroskopisch eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte in der Tumorzone auf. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in diesem Bereich betrug $10,62 \pm 13,01$ (Tabelle 7).

In 28 der 56 Tumorproben war eine Invasionszone auszumachen. Diese war bei 26 Präparaten durch eine „mittlere“ NCAM-140-Expressionsdichte gekennzeichnet. Lediglich bei je einer Probe der Invasionszone konnte eine makroskopisch wahrnehmbare „hohe“ beziehungsweise „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte festgestellt werden. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in der Invasionszone betrug $87,03 \pm 23,84$ (Tabelle 7).

Beim direkten Vergleich von Tumorzone und Invasionszone anhand des Wilcoxon-Tests konnte veranschaulicht werden, dass die Invasionszone bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere NCAM-140-Expressionsdichte als die Tumorzone aufzeigte (Tabelle 8). Die Abbildung 5 veranschaulicht das Ergebnis.

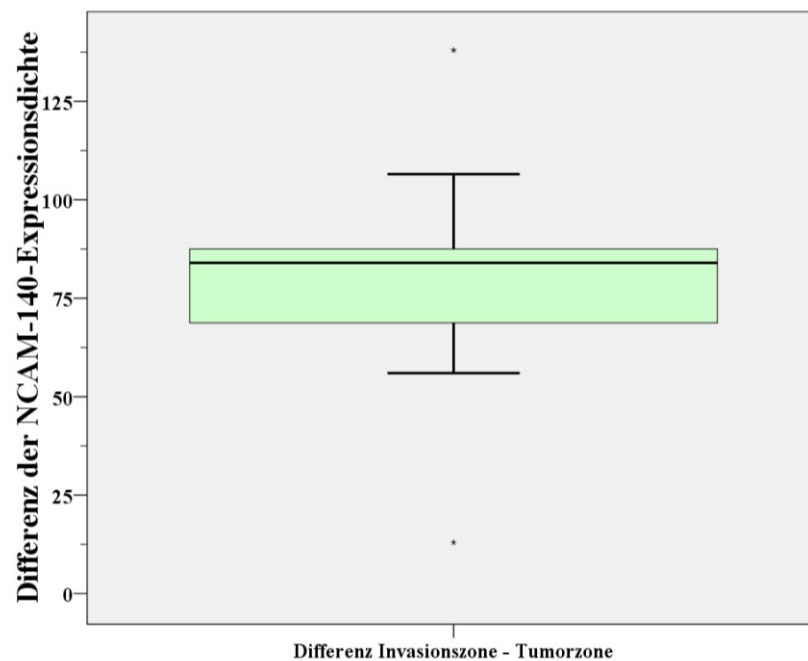


Abbildung 5: Differenzen der makroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte von Invasionszone und Tumorzone bei ein und derselben Tumorprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere NCAM-140-Expression der Invasionszone gegenüber der Tumorzone verdeutlicht. Die Sterne markieren Ausreißer.

5.1.1.3 NCAM-140-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe

Hierbei wurden die makroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichten der einzelnen Gewebeproben von der Tumorzone beziehungsweise der Invasionszone mit den Referenzproben bestehend aus grauer und weißer Substanz direkt miteinander verglichen. Dabei erfolgte die Signifikanzprüfung mithilfe des Mann-Whitney-Tests.

Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe bestand. Dabei zeigte die Tumorzone bei $p < 0,001$ eine signifikant geringere NCAM-140-Expression gegenüber der grauen beziehungsweise der weißen Substanz. Die Invasionszone hingegen exprimierte bei $p < 0,001$ signifikant weniger NCAM-140 als die graue Substanz. Jedoch gegenüber der weißen Substanz wies die Invasionszone bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere NCAM-140-Expressionsdichte auf (Tabelle 8). Die Abbildung 6 sowie die grafische Darstellung in Abbildung 7 veranschaulichen diese Aussagen.

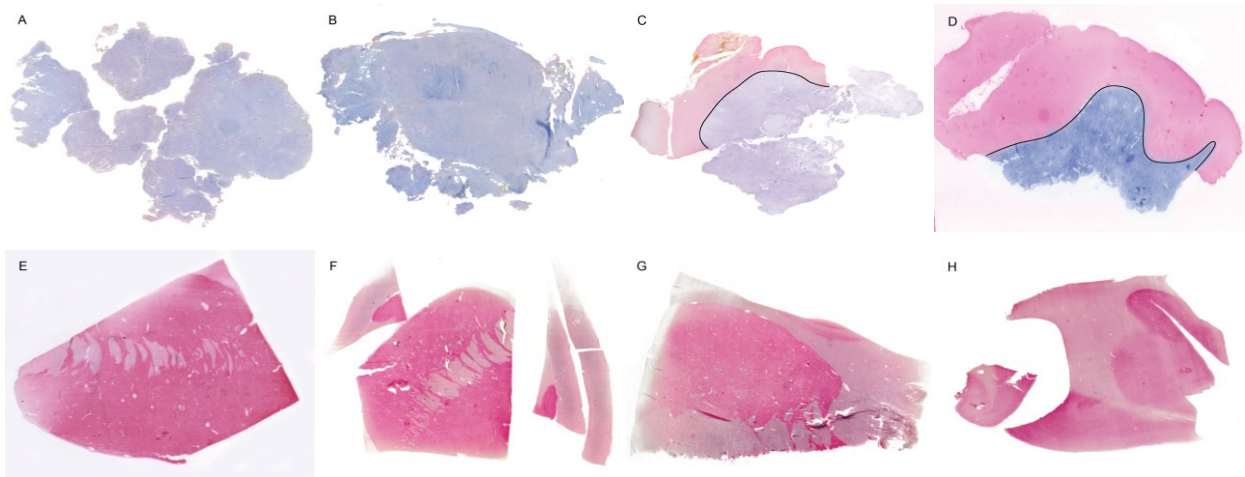


Abbildung 6: Makroskopisch sichtbare NCAM-140-Immunreaktivität

A bis D Glioblastomproben: Die Tumorzone ist in Abbildung A bis D NCAM-140-negativ. In der Abbildung C und D befindet sich im oberen Teil des Bildes jeweils eine moderat bis stark gefärbte NCAM-140-positive Invasionszone. Die eingefügte Hilfslinie in Abbildung C und D veranschaulicht eine relativ scharfe Tumorgrenze.

E bis H Referenzproben: Die graue Substanz weist eine starke rötliche Färbung auf, welche eine starke NCAM-140-Expression widerspiegelt. Die weiße Substanz zeichnet sich hingegen durch die schwach rötliche bis gräulich schimmernde Färbung aus, welche eher eine schwache NCAM-140-Expression erkennen lässt.

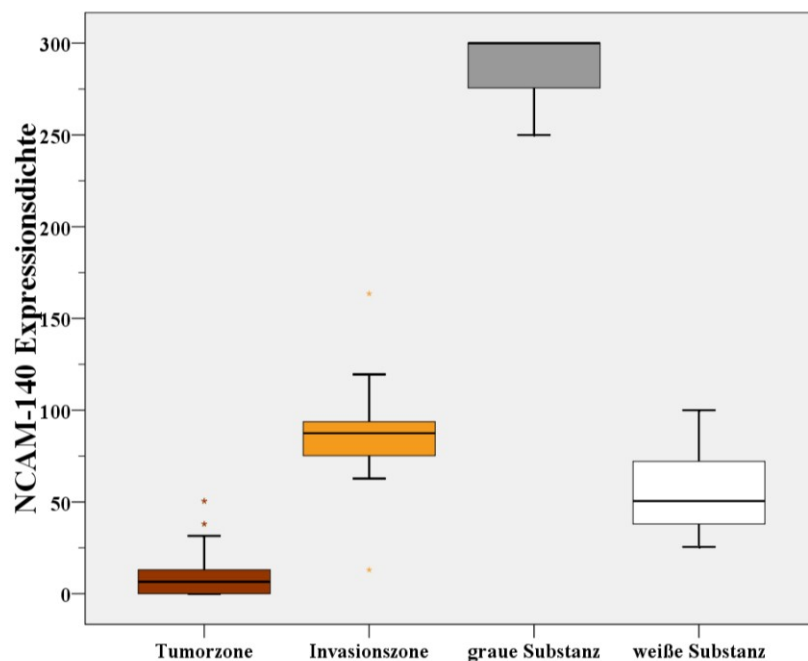


Abbildung 7: Makroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte des Tumorgewebes und des Referenzgewebes

Signifikant geringere NCAM-140-Expression der Tumorzone und der Invasionszone gegenüber der grauen Substanz. Ebenfalls signifikant geringere NCAM-140-Expression der Tumorzone gegenüber der weißen Substanz, jedoch weist die Invasionszone eine signifikant höhere NCAM-140-Expressionsdichte als die weiße Substanz auf. Die Sterne markieren Ausreißer.

Tabelle 7: Makroskopisch ermittelte Mittelwerte und einfache Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz	weiße Substanz
Mittelwert	10,62	87,03	287,98	55,06
Standardabweichung	13,01	23,84	20,16	19,53

Tabelle 8: Ergebnisse der statistischen Auswertung von der makroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte

Signifikante Unterschiede sind gelb makiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz
Invasionszone	< 0,001	x	x
graue Substanz	< 0,001	< 0,001	x
weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001

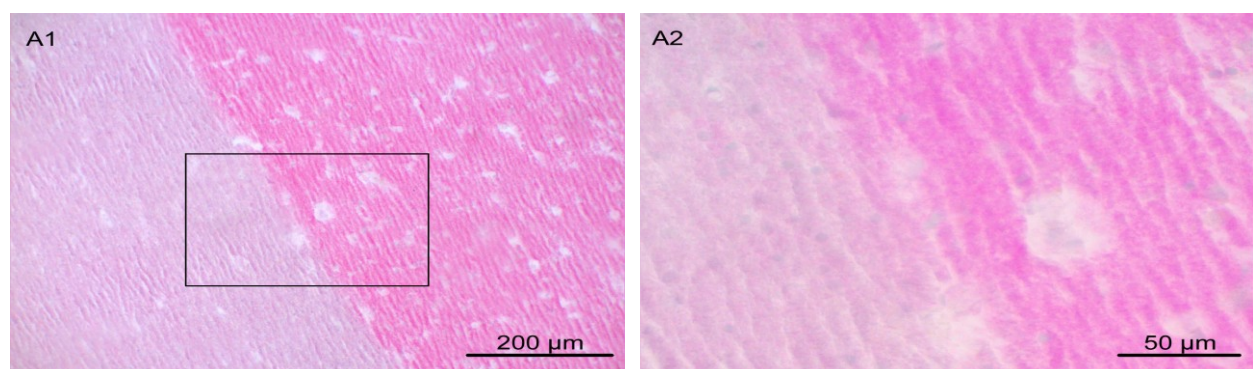
5.1.2 Lichtmikroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression

5.1.2.1 NCAM-140 im Referenzgewebe

Bei der lichtmikroskopischen Analyse zeigten alle 20 Referenzproben der grauen Substanz eine „sehr hohe“ NCAM-140-Expressionsdichte. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in der grauen Substanz betrug $279,85 \pm 22,24$ (Tabelle 9).

Die weiße Substanz wies in 95 % der Fälle eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte auf. Lediglich in einer Probe fand eine „mittlere“ NCAM-140-Expression statt. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in der weißen Substanz betrug $48,73 \pm 6,88$ (Tabelle 9).

Die Signifikanzprüfung zwischen der grauen und weißen Substanz erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Dabei war bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere Expression des NCAM-140-Antigens in der grauen Substanz zu verzeichnen (Tabelle 10). Die Abbildung 8 und die grafische Darstellung in Abbildung 9 veranschaulichen diese Ergebnisse.



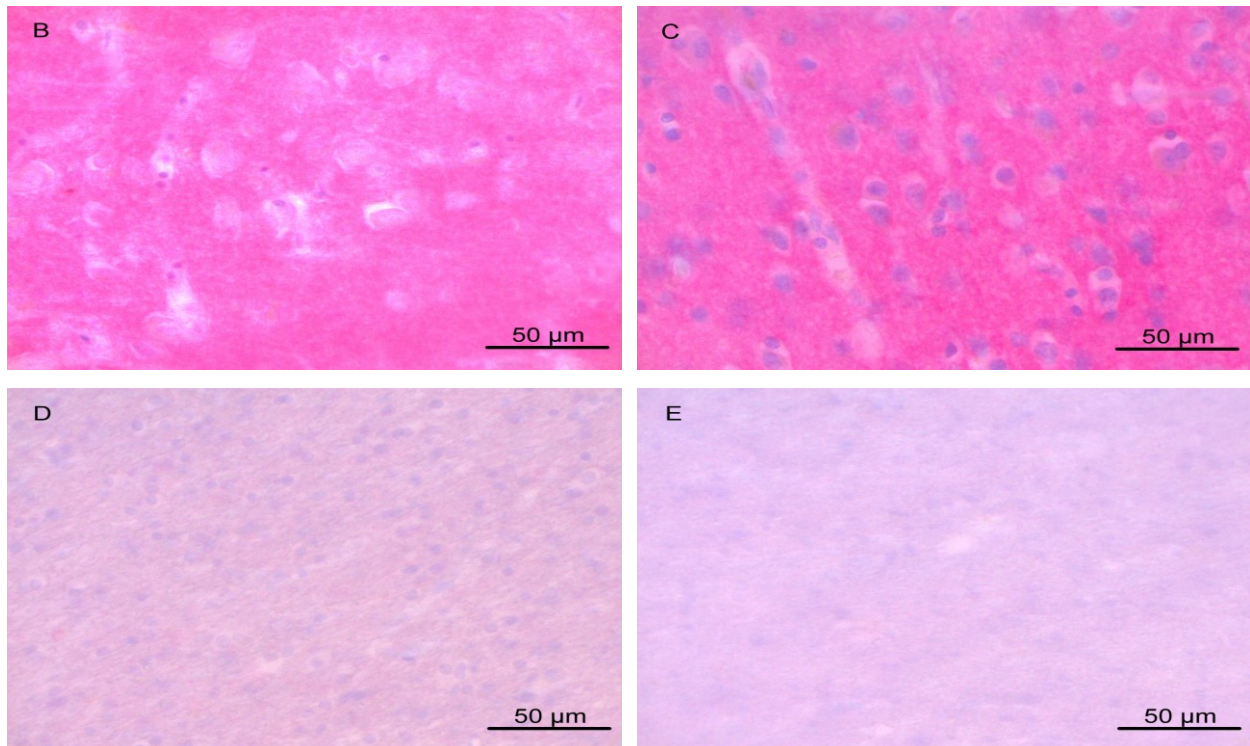


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Darstellung der NCAM-140-Immunreaktivität des Referenzgewebes von grauer und weißer Substanz

A1 zeigt den Grenzbereich zwischen grauer und weißer Substanz auf. A2 ist die Vergrößerung des in A1 markierten Ausschnittes. In B und C ist die starke NCAM-140-Immunreaktivität der grauen Substanz abgebildet. In den Abbildungen D und E ist die eher schwächere NCAM-140-Immunreaktivität der weißen Substanz zu sehen. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

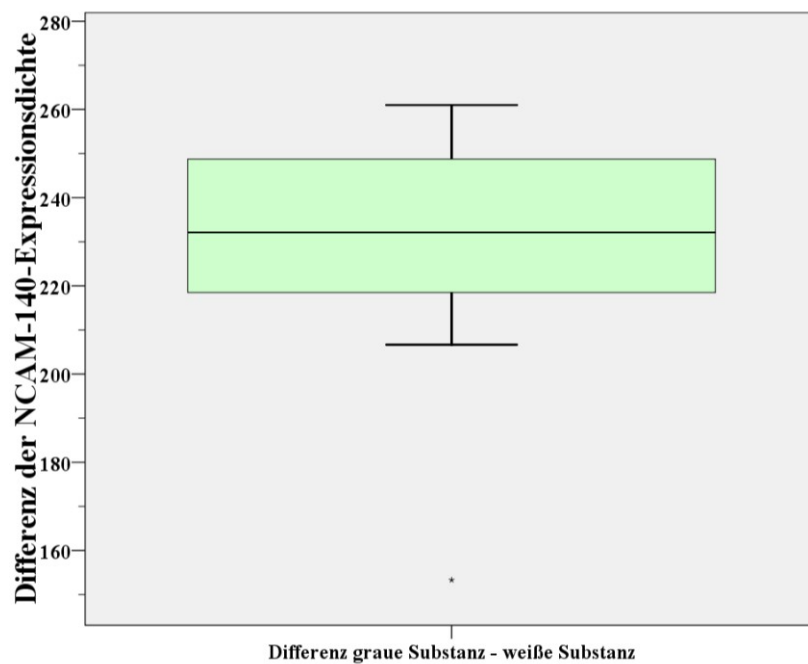


Abbildung 9: Differenzen der lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte von grauer Substanz und weißer Substanz bei ein und derselben Referenzprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere NCAM-140-Expression der grauen Substanz gegenüber der weißen Substanz verdeutlicht. Der Stern markiert einen Ausreißer.

5.1.2.2 NCAM-140 im Tumorgewebe von Glioblastomen

Bei der lichtmikroskopischen Analyse der Glioblastompräparate zeigte die Tumorzone bei 31 Proben eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte, wobei diese allerdings bei allen Proben nur sehr schwach ausgeprägt war. Die übrigen 25 Tumorzonen waren durchgängig NCAM-140-negativ. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in der Tumorzone betrug $2,45 \pm 2,92$ (Tabelle 9).

28 der 56 Tumorproben enthielten zusätzlich eine Invasionszone. Dabei war in 26 Proben, eine „mittlere“ NCAM-140-Expressionsdichte zu sehen. In 2 Präparaten ergab sich sogar eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in diesem Bereich betrug $85,94 \pm 21,23$ (Tabelle 9).

Anhand der statistischen Auswertung unter Zuhilfenahme des Wilcoxon-Tests konnte bei $p < 0,001$ gezeigt werden, dass die Invasionszone eine signifikant höhere NCAM-140-Expression aufwies als die Tumorzone (Tabelle 10). Diese Ergebnisse sind Abbildung 10 und der grafischen Darstellung in Abbildung 11 zu entnehmen.

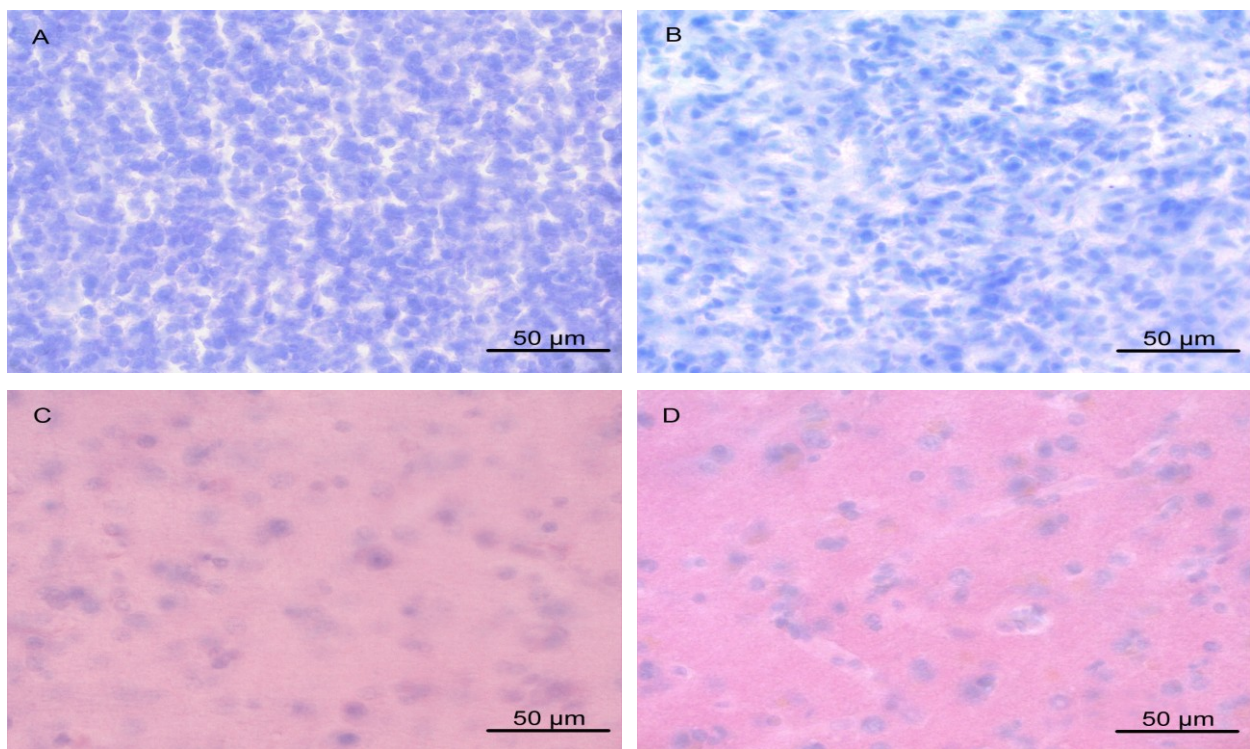


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Darstellung der NCAM-140-Immunreaktivität des Tumorgewebes von Glioblastomen

A und B stellen die NCAM-140-negative Tumorzone dar. Diese ist durch die fehlende rötliche Zellfärbung gekennzeichnet. C und D veranschaulichen die Invasionszone, welche anhand der moderaten NCAM-140-Immunreaktivität erkennbar ist. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

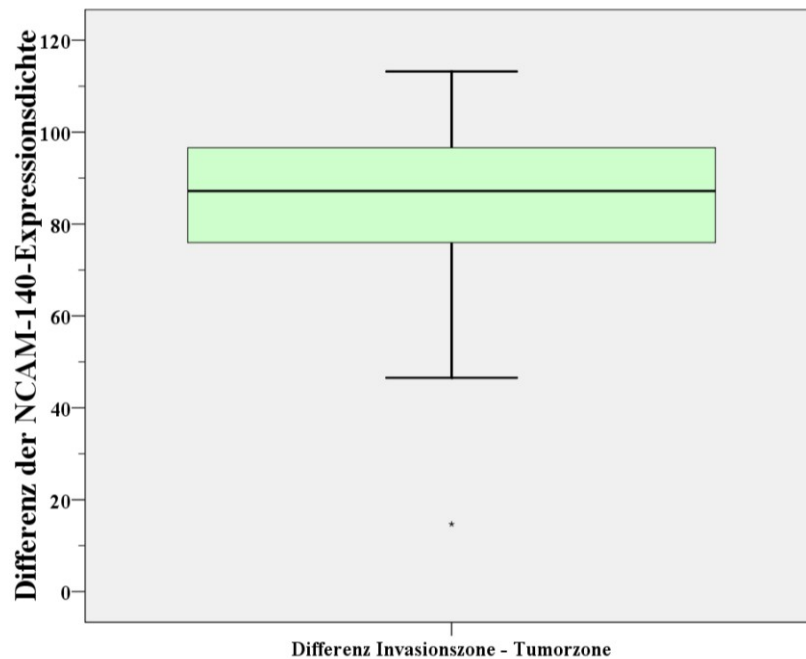


Abbildung 11: Differenzen der lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte von Invasionszone und Tumorzone bei ein und derselben Tumorprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere NCAM-140-Expression der Invasionszone gegenüber der Tumorzone verdeutlicht. Der Stern markiert einen Ausreißer.

5.1.2.3 NCAM-140-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe

Es fand ein direkter Vergleich der lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichten von Tumorgewebe und Referenzgewebe statt. Die Signifikanzprüfung erfolgte dabei durch den Mann-Whitney-Test.

Es zeigte sich, dass die Tumorzone bei $p < 0,001$ eine signifikant geringere NCAM-140-Expression gegenüber der grauen beziehungsweise weißen Substanz aufwies. Die Invasionszone hingegen exprimierte bei $p < 0,001$ signifikant weniger NCAM-140 gegenüber der grauen Substanz. Jedoch bei der Betrachtung von Invasionszone und weißer Substanz konnte eine gegenläufige Aussage getroffen werden. Hier war die Invasionszone bei $p < 0,001$ signifikant NCAM-140-positiver als die weiße Substanz (Tabelle 10). Die Abbildung 12 und die grafische Darstellung in Abbildung 13 vermitteln einen Eindruck dieser Ergebnisse.

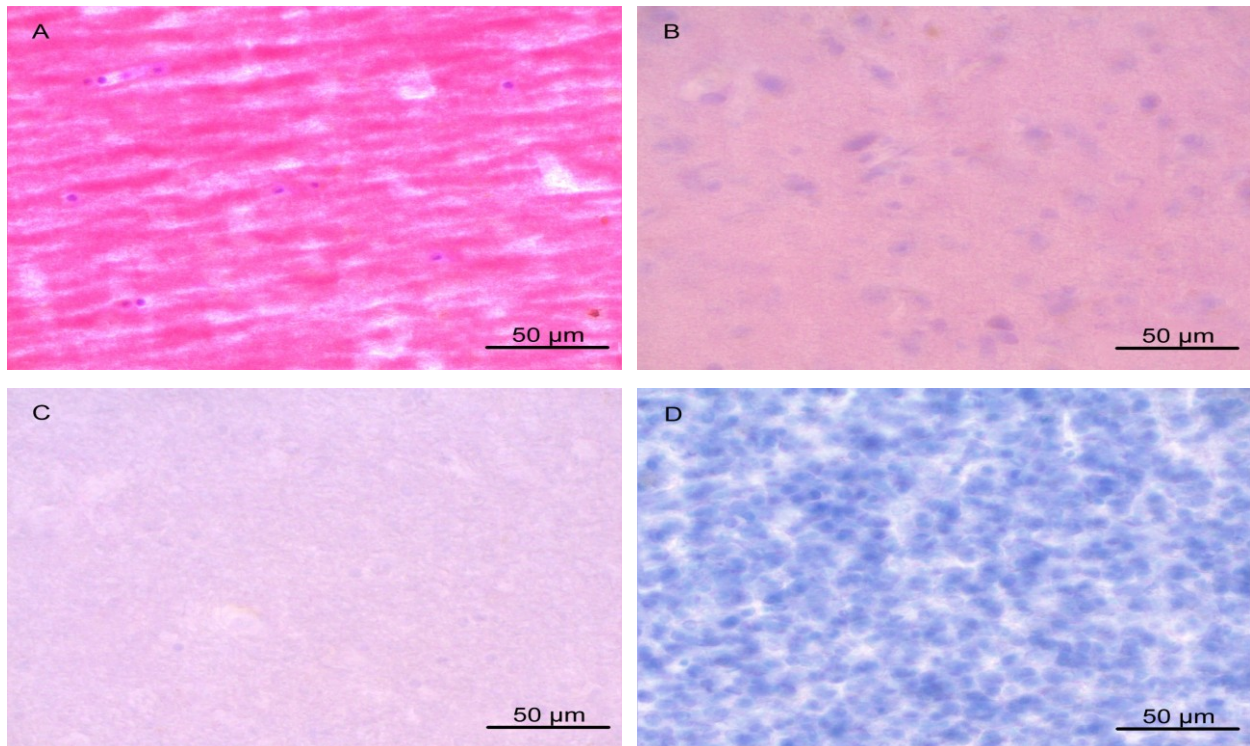


Abbildung 12: Lichtmikroskopische NCAM-140-Immunreaktivität in den Tumor- und Referenzproben

Abgebildet sind die graue Substanz (A), die Invasionszone (B), die weiße Substanz (C) und die Tumorzone (D). Die Rotfärbung spiegelt die NCAM-140-Expressionsdichte wider. Dabei ist zu sehen, dass die NCAM-140-Expression in der grauen Substanz über die Invasionszone und weiße Substanz bis hin zur Tumorzone stufenweise abnimmt. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

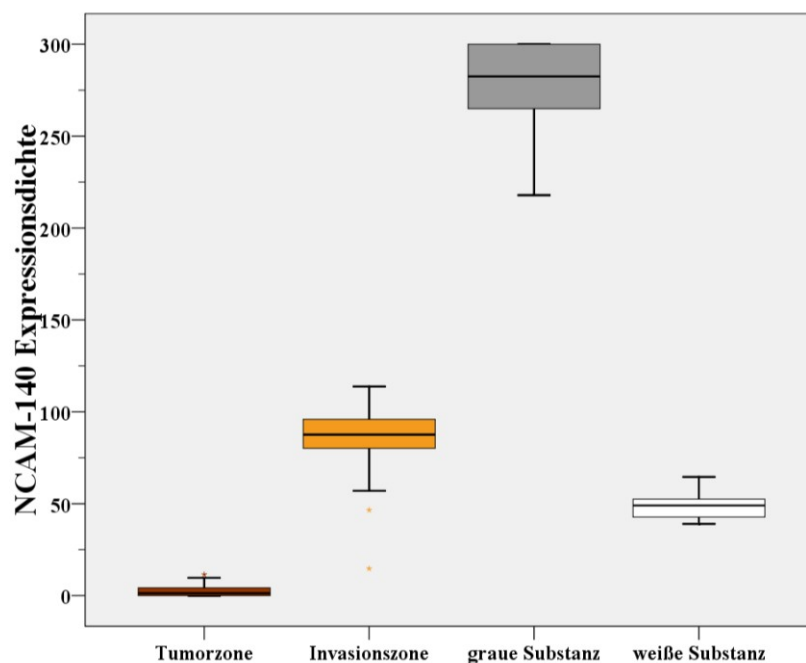


Abbildung 13: Lichtmikroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte des Tumorgewebes und des Referenzgewebes

Signifikant geringere NCAM-140-Expression der Tumorzone und Invasionszone gegenüber der grauen Substanz; ebenfalls signifikant geringere NCAM-140-Expression der Tumorzone gegenüber der weißen Substanz, jedoch verhält sich die Invasionszone auf signifikantem Niveau genau umgekehrt. Die Sterne markieren Ausreißer.

Tabelle 9: Lichtmikroskopisch ermittelte Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz	weiße Substanz
Mittelwert	2,45	85,94	279,85	48,73
Standardabweichung	2,92	21,23	22,24	6,88

Tabelle 10: Ergebnisse der statistischen Auswertung von der mikroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte

Signifikante Unterschiede sind gelb makiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz
Invasionszone	< 0,001	x	x
graue Substanz	< 0,001	< 0,001	x
weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001

5.1.3 Vergleich zwischen makroskopischer und lichtmikroskopischer Betrachtung

Bei der makroskopischen und lichtmikroskopischen Analyse der NCAM-140-Expressionsdichte der grauen Substanz zeigte sich in beiden Bestimmungen bei allen 20 Proben eine „sehr hohe“ NCAM-140-Expressionsdichte. Bei der weißen Substanz wurde bei beiden Analysen vorwiegend eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte ermittelt. Anhand des Wilcoxon-Tests mit der Mindestanforderung $p < 0,05$ konnte gezeigt werden, dass sich beim Vergleich innerhalb der grauen Substanz bei $p = 0,068$ und innerhalb der weißen Substanz bei $p = 0,177$ kein signifikanter Unterschied ergab. Aufgrund des stark ausgebildeten Expressionsunterschiedes von NCAM-140 innerhalb des Referenzgewebes kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sowohl die lichtmikroskopische als auch die makroskopische Analyse bei grauer und weißer Substanz zum gleichen Ergebnis führen und für die Bewertung analog angewendet werden können.

Bei der Bestimmung der NCAM-140-Expressionsdichte in der Invasionszone konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl bei der makroskopischen als auch bei der lichtmikroskopischen Betrachtung die NCAM-140-Expression vorwiegend ein „mittlerer“ Bereich anzutreffen war. Unter Zuhilfenahme des Wilcoxon-Tests ($p < 0,05$), war bei $p = 0,733$ kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Analyseverfahren zu verzeichnen.

Lediglich bei der makroskopischen und lichtmikroskopischen Analyse innerhalb der Tumorzone ergaben sich Unterschiede. Es lagen zwar bei der makroskopischen und lichtmikroskopischen Bestimmung die NCAM-140-Expressionsdichten vorwiegend im „niedrigen“ Bereich, beziehungsweise war eine vollständige NCAM-140-Negativität zu verzeichnen. Jedoch waren die Werte bei der lichtmikroskopischen Betrachtung im „niedrigen“ Bereich insgesamt

schwächer ausgebildet als bei der makroskopischen Betrachtung, sodass sich anhand der Signifikanzprüfung mit dem Wilcoxon-Test bei $p < 0,001$ ein signifikanter Unterschied ergab. Da die Differenzen der lichtmikroskopisch gewonnenen Werte innerhalb des Tumorgewebes über den makroskopisch gewonnenen lagen, ist davon auszugehen, dass die lichtmikroskopische Beurteilung genauer ist als die makroskopische Analyse. Somit kann die Behauptung aufgestellt werden, dass eine Unterscheidung in Tumor- und Invasionszone lichtmikroskopisch genauer möglich ist als durch alleinige makroskopische Betrachtung. Dennoch muss man sagen, dass sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch eine scheinbare „Tumorgrenze“ ausgemacht werden konnte. Eine exakte Beurteilung kann jedoch nur durch die lichtmikroskopische Analyse erfolgen.

5.1.4 Abgrenzbarkeit zwischen Tumorzone und Invasionszone

In den Abschnitten 5.1.1.2 und 5.1.2.2 konnte gezeigt werden, dass in der Invasionszone eine deutlich höhere NCAM-140-Expressionsdichte als in der Tumorzone zu verzeichnen war. Daher wurde im folgenden Abschnitt untersucht, ob eine scheinbare Tumorgrenze am Übergang von Tumorzone zur Invasionszone identifiziert werden konnte. Dabei wurden die 28 Präparate untersucht, bei denen neben einer Tumorzone auch eine Invasionszone vertreten war. Berücksichtigung für die Bewertung konnten allerdings nur 24 der Tumorproben finden. Denn bei diesen handelte es sich offensichtlich um gewebemorphologisch benachbarte Bereiche. Die übrigen vier Präparate wiesen Gewebestücke auf, bei denen nicht eindeutig der Ursprung der eigentlichen Position zugeordnet werden konnte. Sie wurden auf einen Umschlag von NCAM-140-negativen Bereichen zu NCAM-140-positiven Bereichen hin untersucht.

Bei der Charakterisierung der scheinbaren Tumorgrenze wurde zwischen einer diffusen Einzelzellinvasion, einer diffusen Invasion von Tumorzellnestern und einer scharfen Tumorgrenze unterschieden. Weiterhin existierte eine sogenannte Übergangsform, welche eine Zwischenstellung innerhalb von den drei Varianten einnahm und damit eine Tumorgrenze nur mäßig wahrnehmbar war.

Eine diffuse Einzelzellinvasion war in 33,3 %, der zu untersuchenden Glioblastomen zu beobachten. Die scharfe Tumorgrenze war zu 20,8 % vertreten. Eine diffuse Invasion von Tumorzellnestern trat in keiner der Proben auf. Hingegen waren Übergangsformen mit 45,9 %, am häufigsten wahrzunehmen (Tabelle 11). Die grafische Abbildung 14 und die fotografischen Abbildungen 15 und 16 verdeutlichen die Ergebnisse.

Auch bei der makroskopischen Betrachtung konnte bei einem scharfen Umschlag von NCAM-140-negativen Bereichen zu NCAM-140-positiven Bereichen eine scheinbare Tumorgrenze wahrgenommen werden. Die Abbildung 17 unterstreicht diese Aussage.

Tabelle 11: Übersicht über den prozentualen Anteil der Varianten von Tumorgrenzen, die durch die NCAM-140-Immunreaktivität charakterisiert sind

Qualität der Grenze	Anteil von Tumorproben in %
diffuse Einzelzellinvasion	33,3
Übergangsformen	45,9
scharfe Tumorgrenze	20,8
diffuse Invasion von Tumorzellnestern	0

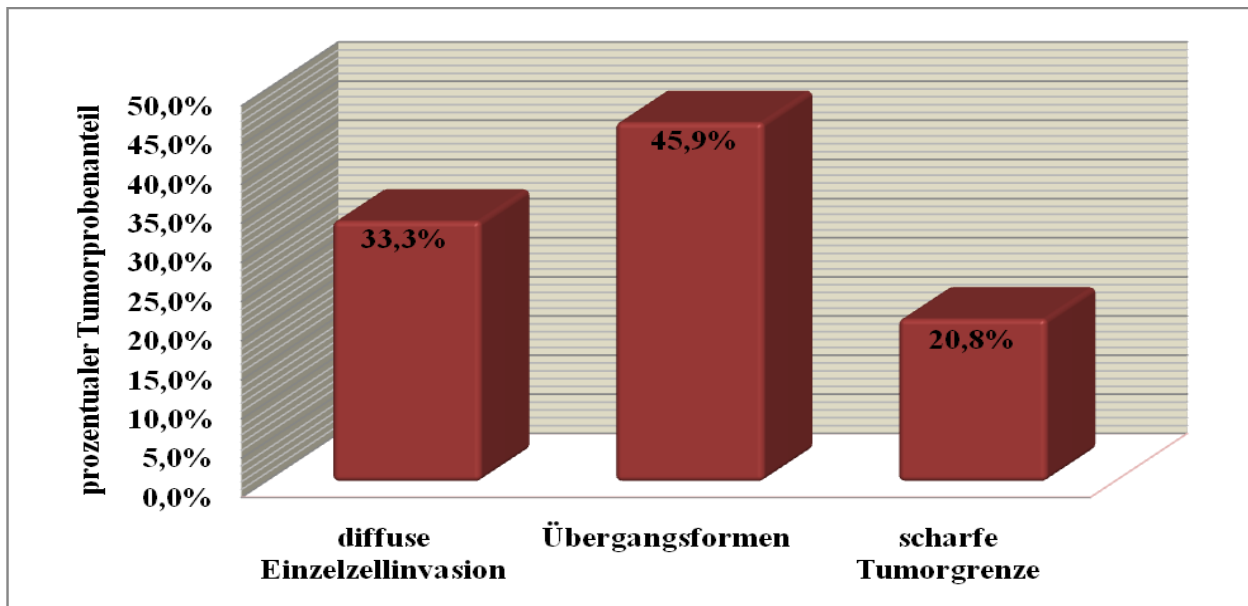
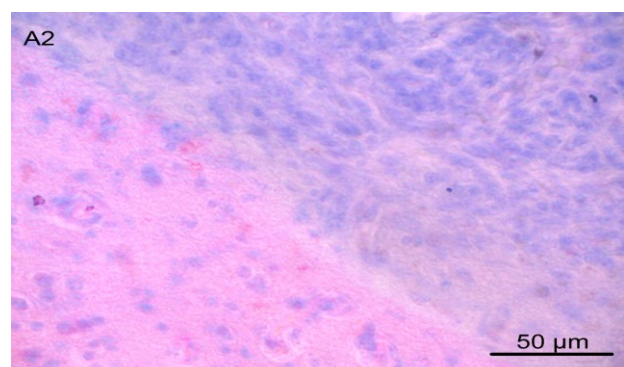
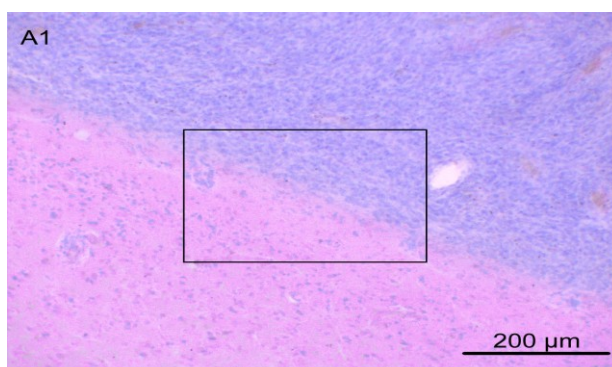


Abbildung 14: Varianten der Tumorgrenzen, die durch die NCAM-140-Immunreaktivität charakterisiert sind

Übergangsformen, welche zwischen der diffusen Einzelzellinvasion und der scharfen Tumorgrenze anzutreffen sind, waren in den zu untersuchenden Glioblastomen am häufigsten vertreten. Die diffuse Einzelzellinvasion trat geringfügig häufiger auf wie die scharfe Tumorgrenze. Eine diffuse Invasion von Tumorzellnestern war in keiner der zu untersuchenden Proben zu finden.



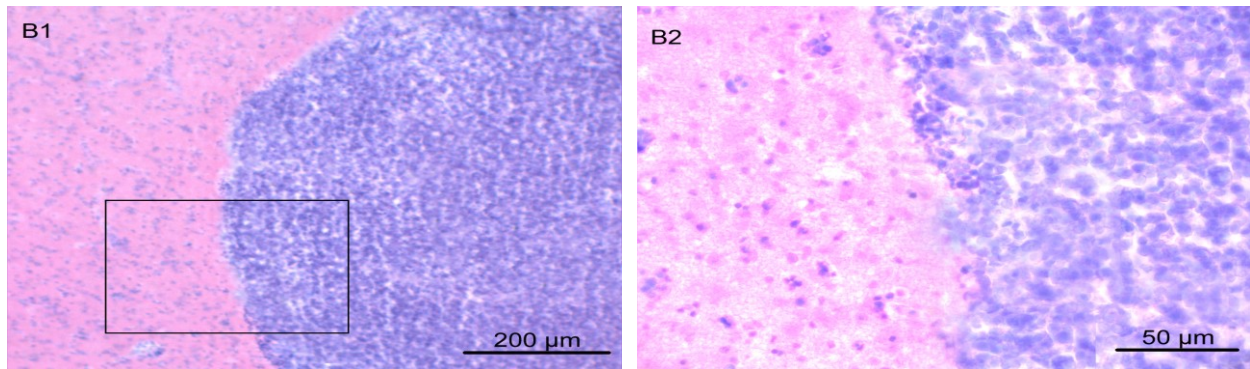


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Darstellung von scharfen Tumorgrenzen

In A1 und B1 sind scharfe Tumorgrenzen zu sehen. Die Invasionszone ist durch die rötliche Färbung NCAM-140-positiv und daher von vollständig NCAM-140-negativ Tumorzona scharf abgrenzbar. A2 und B2 stellen die Vergrößerungen in den von A1 und B1 markierten Bereichen dar. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

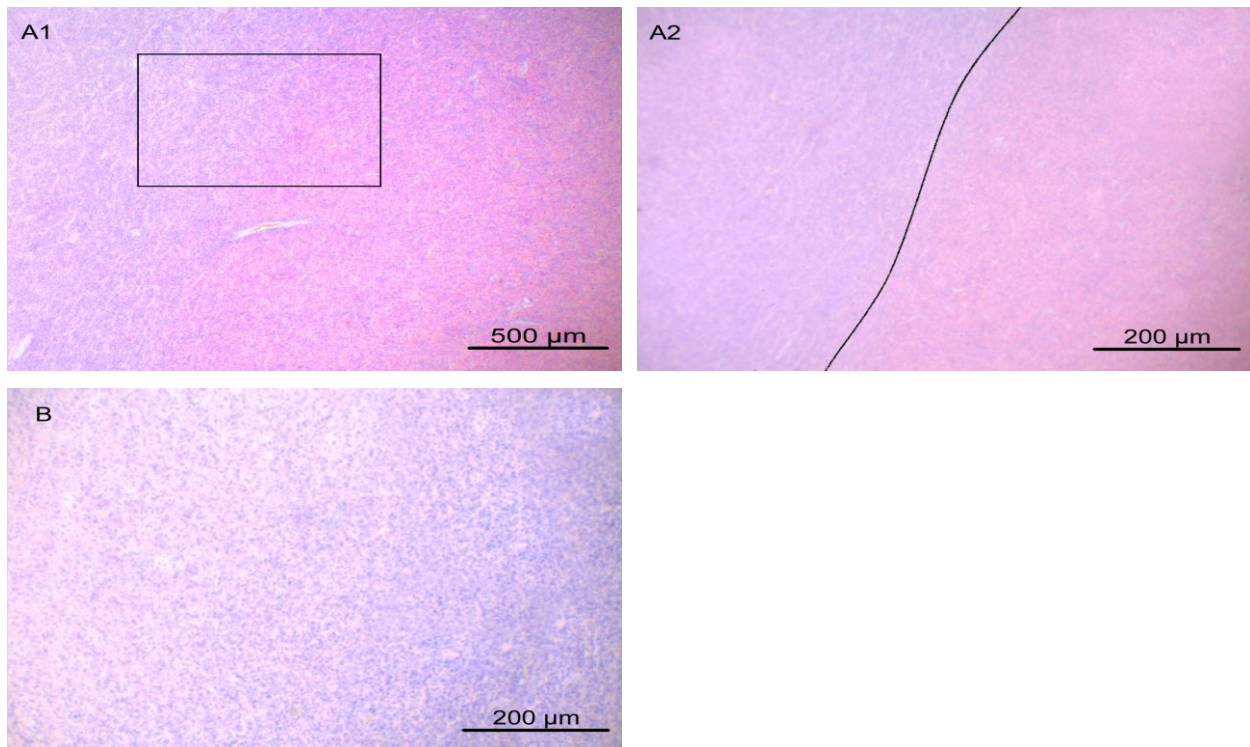


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Darstellung von Tumorgrenzen bei Übergangsformen und diffuser Einzelzellinvasion

Die Abbildung A1 zeigt einen Vertreter, wo die Tumorgrenze eher mäßig abzugrenzen ist und daher eine Art Übergangsform darstellt zwischen scharfer Tumorgrenze und diffuser Einzelzellinvasion. A2 stellt die Vergrößerungen in den von A1 markierten Bereich dar. Die Darstellung B zeigt eine fließende Tumorgrenze und ist daher eher ein Vertreter der diffusen Einzelzellinvasion. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

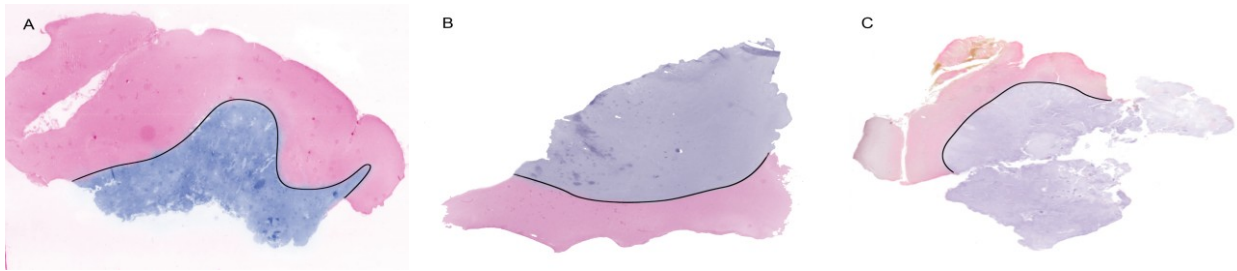


Abbildung 17: Makroskopische Ansicht von NCAM-140 gefärbten Glioblastomproben

Die Tumorzone ist durch die fehlende Rotfärbung aufgrund einer negativen NCAM-140-Immunreaktivität erkennbar. Die deutlich rötliche Färbung zeigt die NCAM-140-positve Invasionszone. In den Abbildungen A bis C bildet der Übergang vom NCAM-140-negativen Bereich zum NCAM-140-positiven Bereich eine relativ scharfe Tumorgrenze, welche durch eine schwarze Hilfslinie makiert ist.

Anhand des χ^2 -Testes wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Häufigkeiten der einzelnen Varianten der Tumorgrenze bestanden. Ein signifikanter Unterschied war bei $p = 0,648$ im Vergleich von diffuser Einzelzellinvasion zu Übergangsformen, nicht anzutreffen. Weiterhin ergab sich bei der Signifikanzprüfung von diffuser Einzelzellinvasion zu scharfer Tumorgrenze bei $p = 0,581$ kein bedeutender Unterschied. Auch der Vergleich Übergangsform und scharfe Tumorgrenze ergab bei $p = 0,210$ keine Signifikanz.

Der Anteil der diffusen Einzelzellinvasion unterschied sich nicht signifikant bei gleichzeitiger Betrachtung von Übergangsform und scharfer Tumorgrenze. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p für das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes betrug 0,152. Fand die gleichzeitige Anschauung von diffuser Einzelzellinvasion und scharfer Tumorgrenze statt und wurde diese den Übergangsformen gegenübergestellt, war ebenfalls bei $p = 0,839$ kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,007$ war der einzige signifikante Unterschied, bei der Betrachtung von einer scharfen Tumorgrenze gegenüber gleichzeitiger Beobachtung von Übergangsform und diffuser Einzelzellinvasion zu verzeichnen (Tabelle 12).

Insgesamt waren damit die signifikanten Unterschiede eher gering ausgebildet, sodass von einem zu geringen repräsentativen Probenumfang ausgegangen werden muss.

Tabelle 12: Ergebnisse des statistischen Vergleiches zwischen der Häufigkeit der beobachteten Varianten einer Tumorgrenze

Signifikante Unterschiede sind gelb markiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	diffuse Einzelzellinvasion	scharfe Tumorgrenze	diffuse Einzelzellinvasion + scharfe Tumorgrenze
Übergangsformen	0,648	0,210	0,839
scharfe Tumorgrenze	0,581	x	x
Übergangsformen + scharfe Tumorgrenze	0,152	x	x
Übergangsformen + diffuse Einzelzellinvasion	x	0,007	x

5.1.5 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Analyse der NCAM-140-Expressionsdichte

Es werden im folgenden Abschnitt die wichtigsten Ergebnisse aus der NCAM-140-Expressionsanalyse zusammengefasst.

Bei der makroskopischen Betrachtung konnte gezeigt werden, dass die graue Substanz signifikant die höchste NCAM-140-Expression von allen untersuchten Geweben aufwies. Hingegen wies die Tumorzone die signifikant geringste NCAM-140-Expressionsdichte von allen zu untersuchenden Geweben auf. Die Invasionszone und die weiße Substanz waren eher durch eine mittlere Antigenexpressionsdichte charakterisiert. Dabei war in der Invasionszone, eine signifikant höhere NCAM-140-Expressionsdichte als in der weißen Substanz zu verzeichnen.

In der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Auch hier sah man von allen zu betrachtenden Geweben die signifikant höchste NCAM-140-Expressionsdichte in der grauen Substanz und die signifikant geringste NCAM-140-Expressionsdichte in der Tumorzone. Ebenfalls zeigten die weiße Substanz und die Invasionszone eine mittlere NCAM-140-Expressionsdichte auf, wobei die Invasionszone gegenüber der weißen Substanz eine signifikant höhere Antigenexpressionsdichte aufwies.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine scheinbare Tumorgrenze auszumachen war. Dabei konnte gezeigt werden, dass im überwiegenden Teil Übergangsformen zu beobachten waren. Eine diffuse Einzelzellinvasion war zwar geringer als die Übergangsformen, jedoch geringfügig häufiger anzutreffen als eine scharfe Tumorgrenze. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Typen von Tumorgrenzen waren eher nicht ausgebildet. In keiner Probe war eine diffuse Invasion von Tumorzellnestern wahrnehmbar. Auch bei der makroskopischen Betrachtung war teilweise eine Tumorgrenze darstellbar.

5.2 Lichtmikroskopische Bewertung der Expression von CD 31

CD 31 ist ein biochemisches Markermolekül auf Endothelzellen. Durch entsprechende immunhistochemische Methoden ließ sich CD 31 anfärben und zeigte somit alle Gefäßstrukturen in einem Hirnschnitt an. Hierdurch war eine direkte Auszählung der einzelnen Gefäße in der Tumorzone, Invasionszone, grauen und weißen Substanz überhaupt erst einmal möglich. Somit ließ die Bewertung der CD 31-Expression einen direkten Rückschluss auf die Gefäßdichte für eine entsprechende Zone zu.

5.2.1 CD 31 im Referenzgewebe

Bei der lichtmikroskopischen Analyse der grauen Substanz konnte in allen zu betrachtenden Proben eine „mittlere“ Gefäßdichte verzeichnet werden. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der Gefäßdichte in der grauen Substanz betrug $4,14 \pm 0,3$ (Tabelle 13).

Hingegen sah man in der weißen Substanz in allen 20 Proben eine „geringe“ Gefäßdichte. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der Gefäßdichte in diesem Bereich betrug $2,59 \pm 0,24$ (Tabelle 13).

Innerhalb des Referenzgewebes erfolgte die Signifikanzprüfung anhand des Wilcoxon-Tests. Bei $p < 0,001$ kam man zu der Feststellung, dass die graue Substanz eine signifikant höhere Gefäßdichte aufwies als die weiße Substanz (Tabelle 14). Die Abbildung 18 und die grafische Darstellung in Abbildung 19 vermitteln einen Eindruck dieser Ergebnisse.

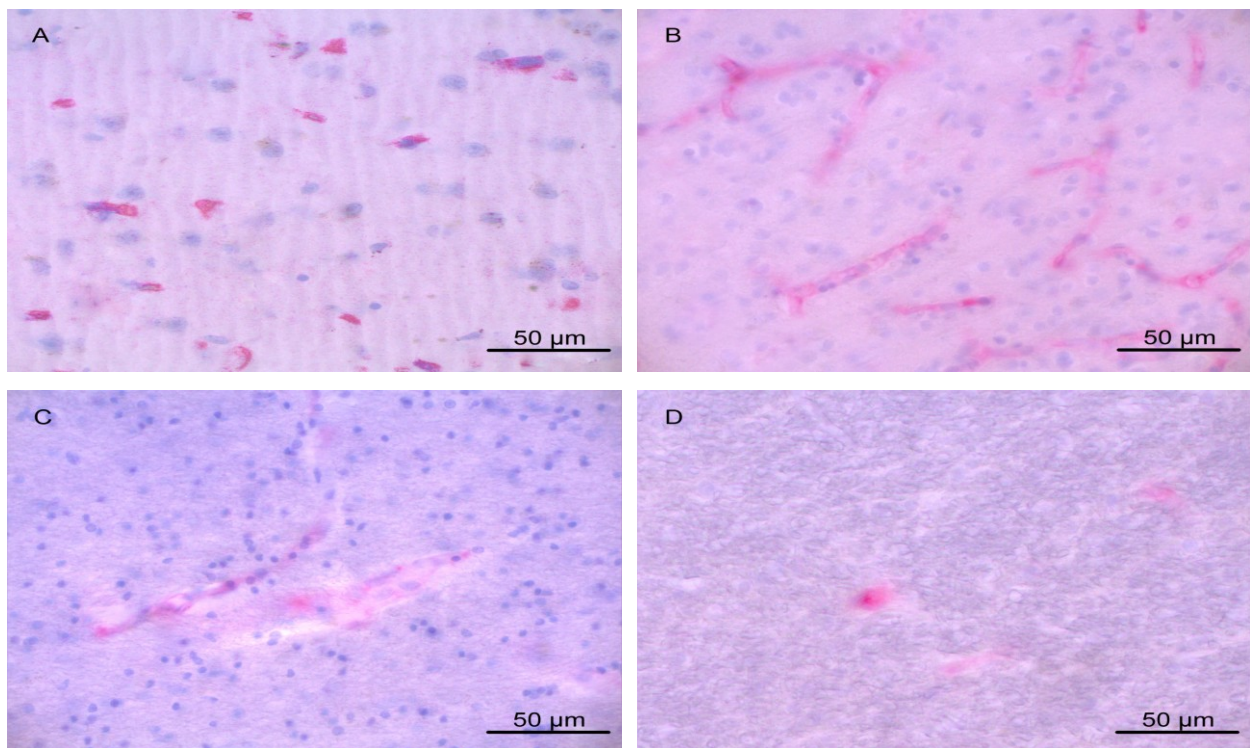


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Darstellung der Gefäßdichte des Referenzgewebes von grauer und weißer Substanz

A und B zeigen die Gefäßdichte in der grauen Substanz. Abbildung C und D verdeutlichen diese von der weißen Substanz. Die Gefäße werden durch die rötliche Zytoplasmafärbung angezeigt. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

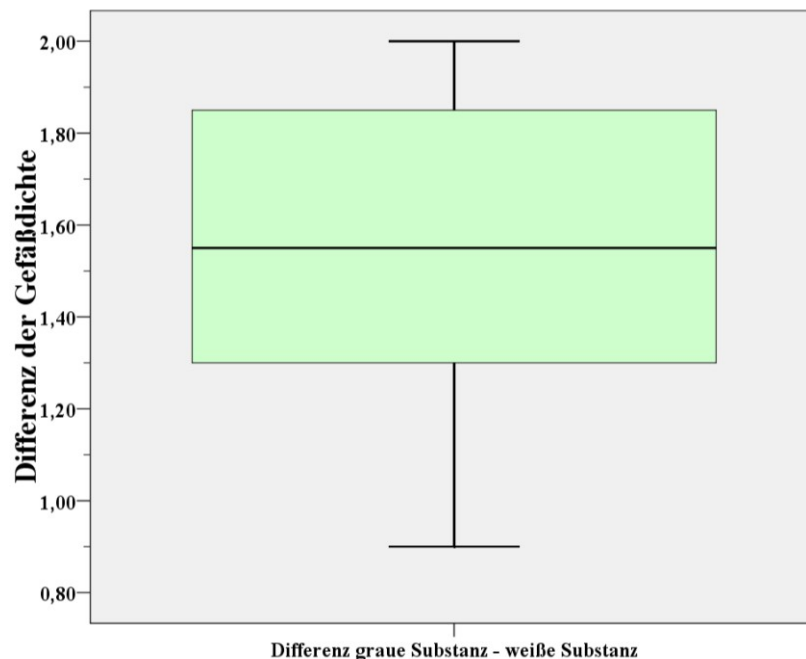


Abbildung 19: Differenzen der lichtmikroskopisch ermittelten Gefäßdichte von grauer Substanz und weißer Substanz bei ein und derselben Referenzprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere Gefäßdichte der grauen Substanz gegenüber der weißen Substanz verdeutlicht.

5.2.2 CD 31 im Tumorgewebe von Glioblastomen

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der insgesamt 56 Tumorzonen konnte in 38 Fällen eine „hohe“ und in 18 Präparaten sogar eine „sehr hohe“ Gefäßdichte gesehen werden. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der Gefäßdichte in der Tumorzone betrug $6,39 \pm 0,58$ (Tabelle 13).

28 der 56 Tumorproben wiesen neben der Tumorzone eine Invasionszone auf. Dabei war in 19 Präparaten eine „geringe“ und in 8 Präparaten eine „mittlere“ Gefäßdichte wahrnehmbar. Lediglich in einer Probe war eine „hohe“ Gefäßdichte auszumachen. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der Gefäßdichte in der Invasionszone betrug $3,5 \pm 0,49$ (Tabelle 13).

Beim direkten Vergleich von Tumorzone und Invasionszone anhand des Wilcoxon-Tests konnte veranschaulicht werden, dass die Tumorzone bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere Gefäßdichte als die Invasionszone aufzeigte (Tabelle 14). Die Abbildung 20 und 21 weisen diese Aussagen aus.

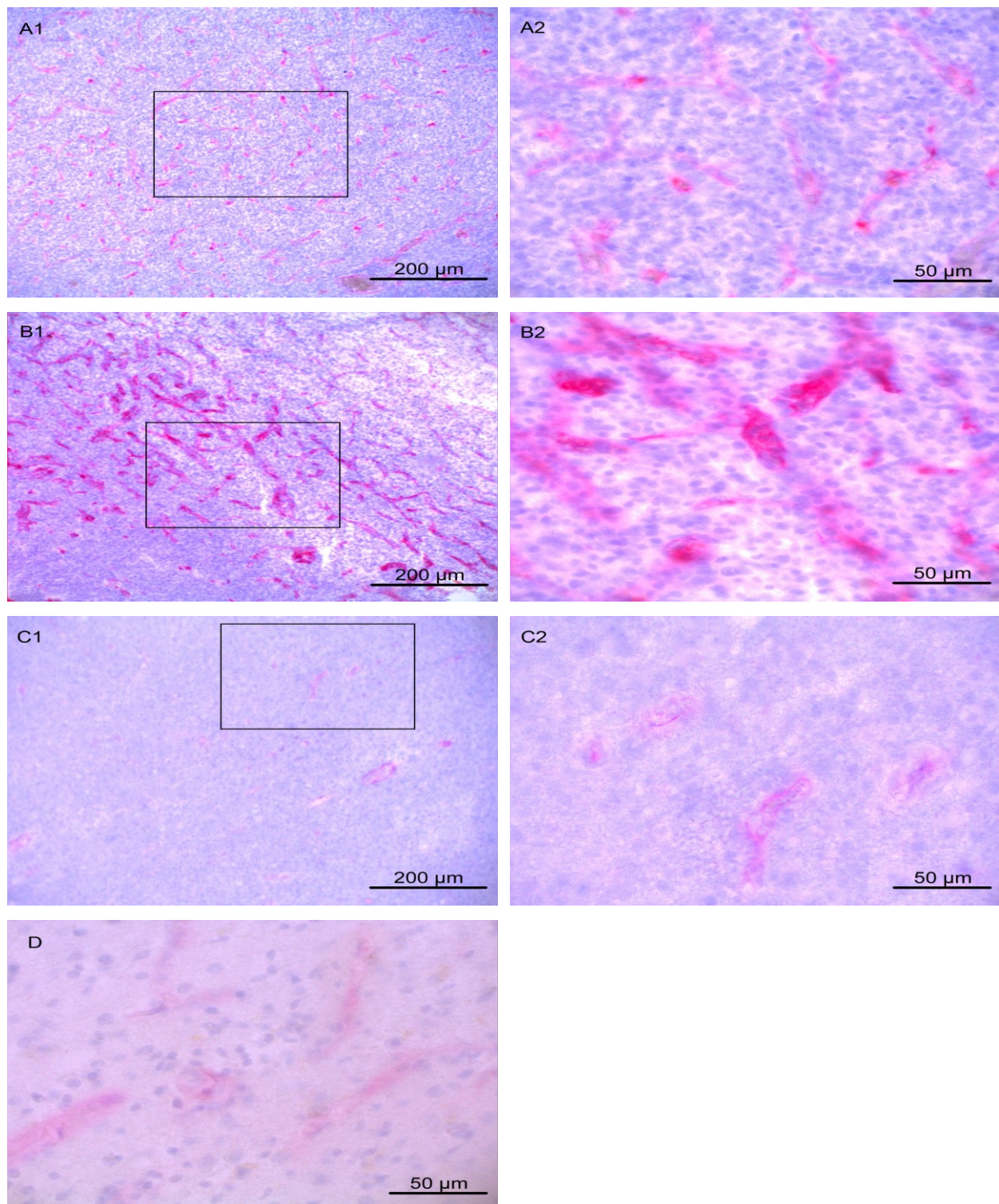


Abbildung 20: Lichtmikroskopische Darstellung der Gefäßdichte des Tumorgewebes von Glioblastomen

Abbildung A1 und B1 verdeutlichen die Gefäßdichte in der Tumorzone von Glioblastomen. A2 und B2 stellt jeweils die Vergrößerung in den von A1 und B1 markierten Bereichen dar. In C1 und D sowie C2, was die Vergrößerung in den von C1 markierten Bereich darstellt, ist die Gefäßdichte in der Invasionszone von Glioblastomen abgebildet. Die Gefäße werden durch die rötliche Zytoplasmafärbung angezeigt. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

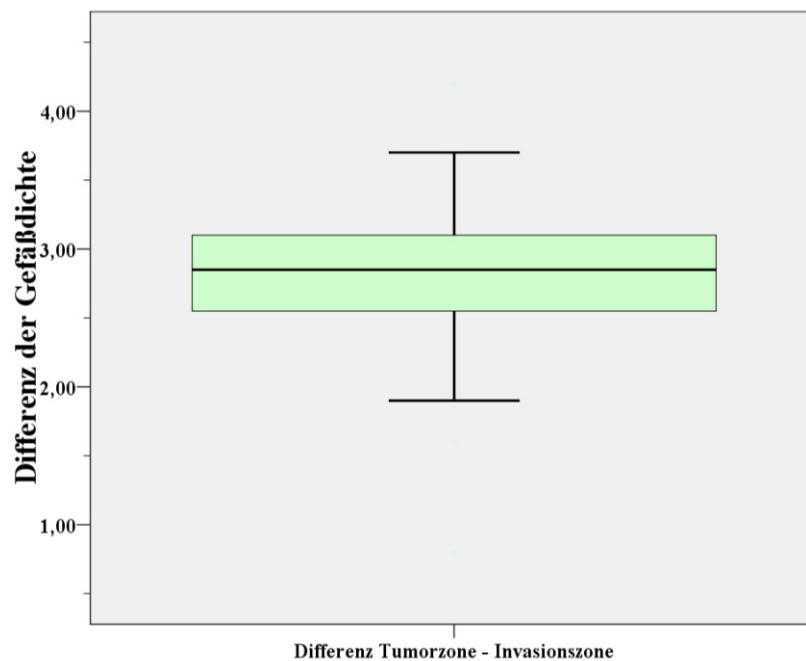


Abbildung 21: Differenz der lichtmikroskopisch ermittelten Gefäßdichte zwischen Tumorzone und Invasionszone der gleichen Tumorprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere Gefäßdichte der Tumorzone gegenüber der Invasionszone verdeutlicht.

5.2.3 CD 31-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe

Es erfolgte ein direkter Vergleich der lichtmikroskopisch erhobenen Gefäßdichten der einzelnen Gewebeproben von der Tumorzone beziehungsweise der Invasionszone mit den Referenzproben bestehend aus grauer und weißer Substanz. Dabei erfolgte die Signifikanzprüfung mithilfe des Mann-Whitney-Tests.

Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe bestand. Dabei zeigte die Tumorzone bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere Gefäßdichte gegenüber der grauen beziehungsweise der weißen Substanz auf. In der Invasionszone konnte bei $p < 0,001$ eine signifikant geringere Gefäßdichte verzeichnet werden als in der grauen Substanz. Jedoch gegenüber der weißen Substanz wies die Invasionszone bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere Gefäßdichte auf (Tabelle 14). Die Abbildung 22 und die grafische Darstellung in Abbildung 23 vermitteln einen Eindruck dieser Ergebnisse.

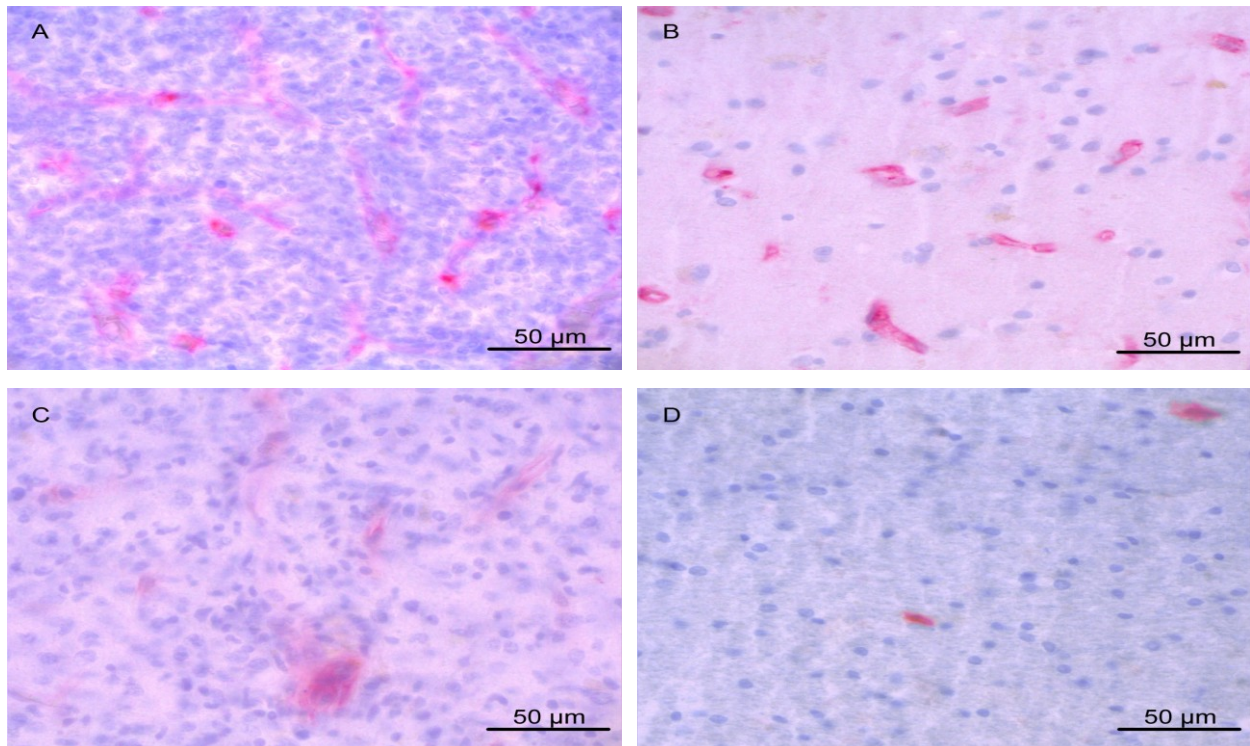


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Darstellung der Gefäßdichte in den Tumor- und Referenzproben

Abgebildet sind die Tumorzone (A), die graue Substanz (B), die Invasionszone (C) und die weiße Substanz (D). Die Gefäße werden durch die rötliche Zytoplasmafärbung angezeigt. Dabei ist zu sehen, dass die Gefäßdichte in der Tumorzone über die graue Substanz und Invasionszone bis hin zur weißen Substanz stufenweise abnimmt. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

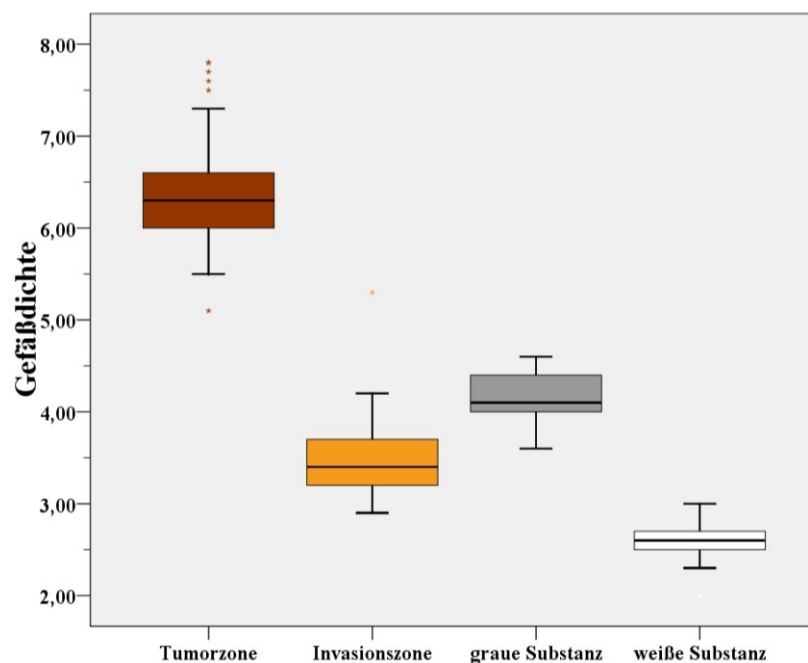


Abbildung 23: Lichtmikroskopisch ermittelte Gefäßdichte des Tumorgewebes und des Referenzgewebes

Signifikant höhere Gefäßdichte der Tumorzone gegenüber der grauen und weißen Substanz. Signifikant geringere Gefäßdichte der Invasionsdichte gegenüber der grauen Substanz, jedoch weist die Invasionszone gegenüber der weißen Substanz eine signifikante höhere Gefäßdichte auf. Die Sterne markieren Ausreißer.

Tabelle 13: Mittelwert und entsprechender einfacher Standardabweichung der CD 31-Expression beziehungsweise Gefäßdichte

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz	weiße Substanz
Mittelwert	6,39	3,5	4,14	2,59
Standardabweichung	0,58	0,49	0,3	0,24

Tabelle 14: Ergebnisse der statistischen Auswertung von der CD 31-Expressionsdichte beziehungsweise Gefäßdichte

Signifikante Unterschiede sind gelb markiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz
Invasionszone	< 0,001	x	x
graue Substanz	< 0,001	< 0,001	x
weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001

5.2.4 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Analyse der Expression von CD 31

Es werden im folgenden Abschnitt die wichtigsten Ergebnisse aus der CD 31-Expressionsanalyse zusammengefasst.

Es konnte bei der lichtmikroskopischen Betrachtung gezeigt werden, dass in den zu betrachtenden Gewebeproben, die signifikant höchste Gefäßdichte in der Tumorzone zu finden war. Hingegen wies die weiße Substanz des Referenzgewebes die signifikant geringste Gefäßdichte auf.

Interessanterweise zeigte die graue Substanz zwar eine signifikant geringere Gefäßdichte gegenüber der Tumorzone, jedoch in Beziehung zur Invasionszone war eine signifikant höhere Gefäßdichte zu verzeichnen.

5.3 Lichtmikroskopische Expression von PAR-1

Zunächst erfolgte unter 5.3.1 die lichtmikroskopische Betrachtung und Beurteilung des Tumor- und Referenzgewebes. Dabei wurde in den Referenzproben zwischen grauer und weißer Substanz sowie in den Tumorproben zwischen Tumor- und Invasionszone unterschieden.

In Abschnitt 5.3.2 erfolgte die PAR-1-Expressionsanalyse von ein- und mehrschichtigen Gefäßen in den determinierten Bereichen von Tumor- und Referenzproben. Da die Blutgefäße in den untersuchten Proben meist nur in den Endothelzellen eine positive Immunreaktivität aufzeigten, wurden auch nur diese beurteilt.

5.3.1 Lichtmikroskopische Bewertung der PAR-1-Expression im Gewebe

5.3.1.1 PAR-1 im Referenzgewebe

Die graue Substanz des tumorfreien Referenzgewebes zeigte in 13 Proben eine „niedrige“ PAR-1-Expressionsdichte. In 5 der insgesamt 20 Proben, war eine „mittlere“ PAR-1-Immunreaktivität zu verzeichnen. Allerdings zeigten auch 2 Präparate eine „hohe“ PAR-1-Expressionsdichte auf. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte in der grauen Substanz betrug $61,37 \pm 29,74$ (Tabelle 15).

In der weißen Substanz des Referenzgewebes war in 20 % eine PAR-1-Negativität vertreten. Hingegen konnte in 15 Präparaten eine „niedrige“ PAR-1-Expressionsdichte gefunden werden, welche jedoch in den überwiegenden Fällen an der Grenze zur vollständigen PAR-1-Negativität anzutreffen war. 5 % der untersuchten Proben zeigten eine mittlere PAR-1-Immunreaktivität. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte in der weißen Substanz betrug $9,55 \pm 20,53$ (Tabelle 15).

Anhand des Wilcoxon-Tests konnte gezeigt werden, dass die graue Substanz bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere PAR-1-Expression aufwies als die weiße Substanz (Tabelle 16). Abbildung 24 und die grafische Darstellung in Abbildung 25 veranschaulichen diese Ergebnisse.

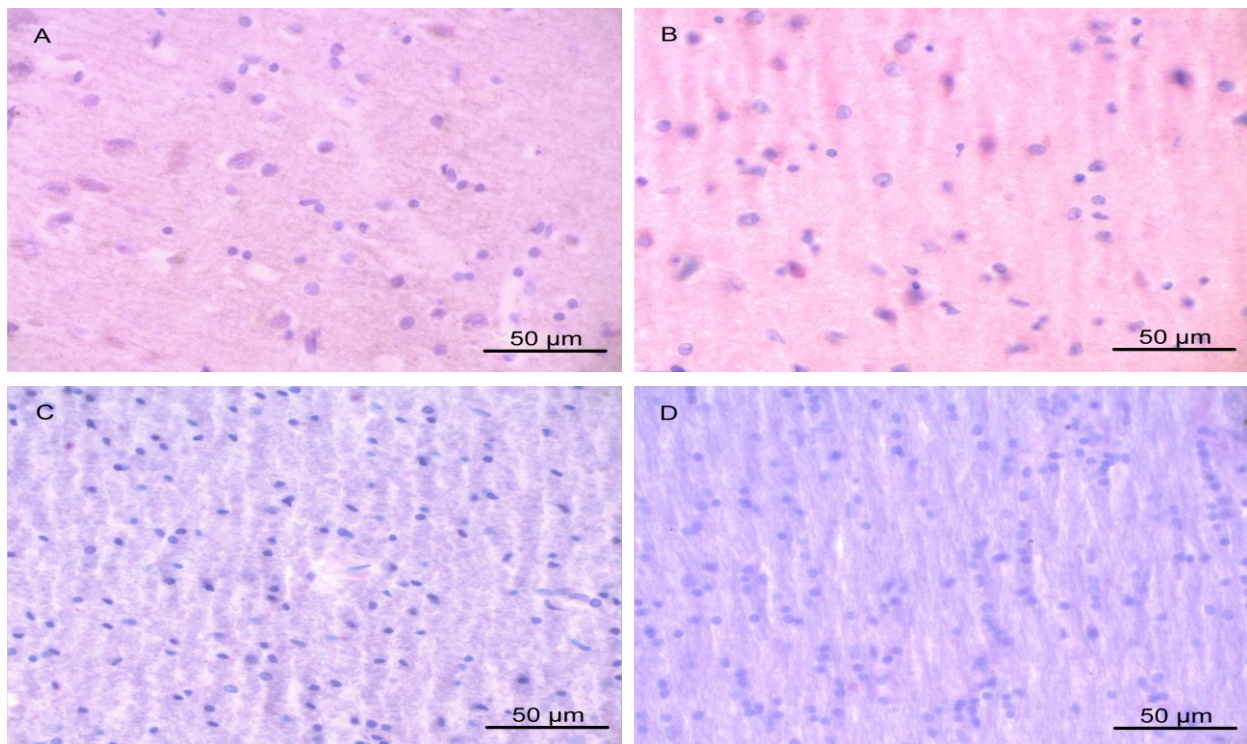


Abbildung 24: Lichtmikroskopische Darstellung der PAR-1-Immunreaktivität des Referenzgewebes von grauer und weißer Substanz

Abbildung A und B zeigt die graue Substanz, welche durch eine schwache bis moderate PAR-1-Expression gekennzeichnet ist. Die Abbildung C und D zeigen Beispiele für eine PAR-1-Negativität auf. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

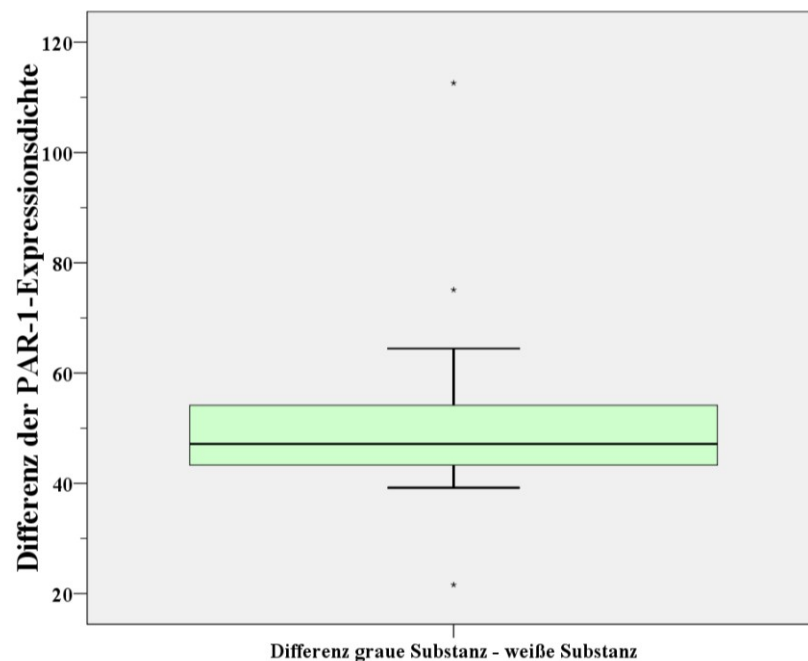


Abbildung 25: Differenzen der lichtmikroskopisch ermittelten PAR-1-Expressionsdichte im Gewebe von grauer Substanz und weißer Substanz bei gleicher Referenzprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere PAR-1-Immunreaktivität der grauen Substanz gegenüber der weißen Substanz verdeutlicht. Die Sterne markieren Ausreißer.

5.3.1.2 PAR-1 im Tumorgewebe von Glioblastomen

Bei der Analyse der Tumorzone von den 56 zu betrachtenden Glioblastompräparaten, war in 50 % eine „sehr hohe“ PAR-1-Expressionsdichte auszumachen. In 15 der 56 Proben, war eine „hohe“ und in 13 eine „mittlere“ PAR-1-Immunreaktivität zu verzeichnen. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der PAR-1-Expression in der Tumorzone betrug $178,39 \pm 55,60$ (Tabelle 15).

Auch hier war bei 28 Präparaten eine Invasionszone vertreten. Bei dieser war in 20 Fällen, eine „mittlere“ PAR-1-Expression anzutreffen. 6 Proben wiesen eine „niedrige“ PAR-1-Immunreaktivität auf. Allerdings war auch in 2 Präparaten, eine „hohe“ PAR-1-Expressionsdichte aufzufinden. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte in diesem Bereich betrug $77,92 \pm 26,06$ (Tabelle 15).

Unter Zuhilfenahme des Wilcoxon-Tests konnte veranschaulicht werden, dass die Tumorzone bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere PAR-1-Expressionsdichte als die Invasionszone aufzeigte (Tabelle 16). Die Abbildung 26 und die grafische Darstellung in Abbildung 21 zeigen diese Aussagen auf.

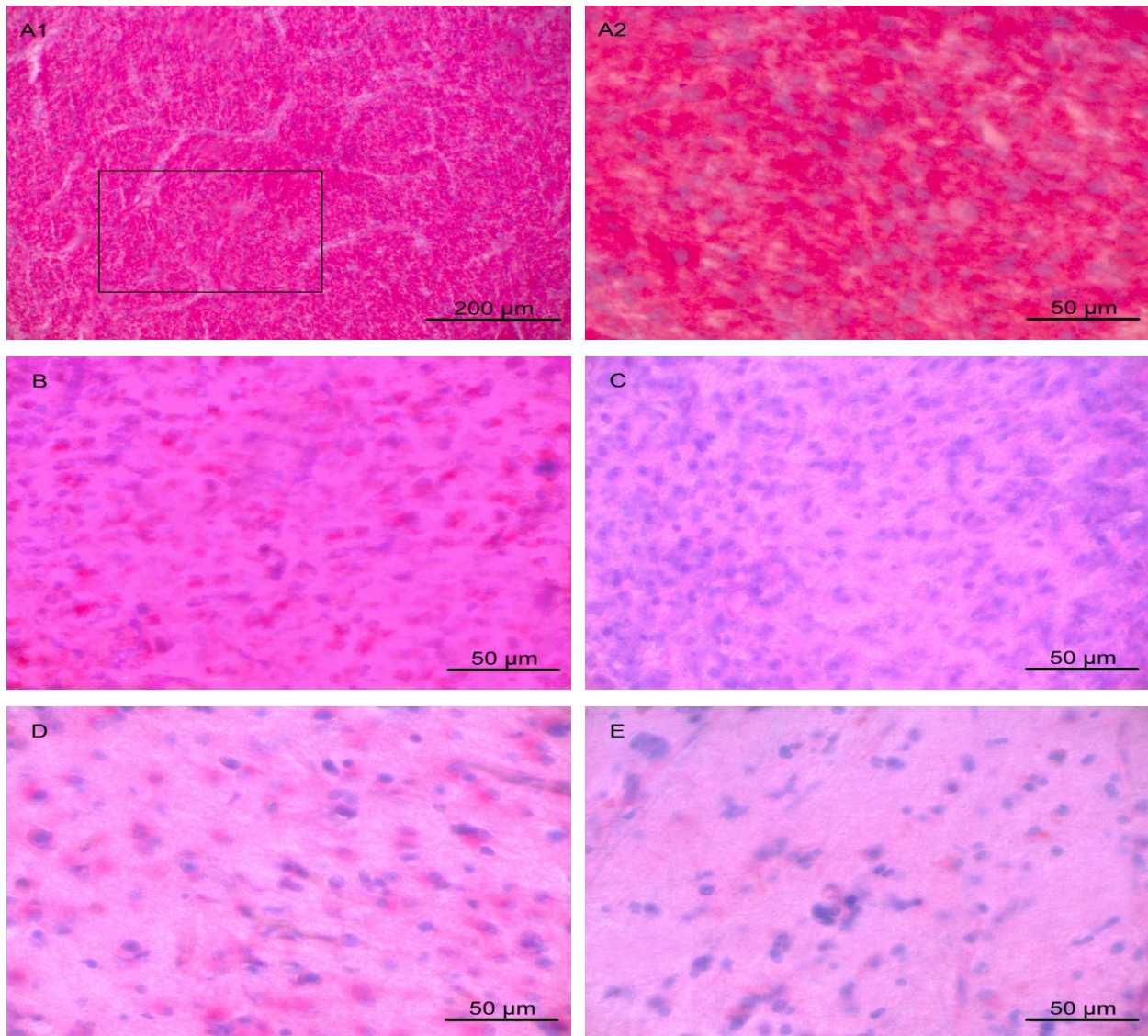


Abbildung 26: Lichtmikroskopische Darstellung der PAR-1-Immunreaktivität des Tumorgewebes von Glioblastomen

In Abbildung A1 ist deutlich Rotfärbung der Tumorzone veranschaulicht. A2 stellt die Vergrößerung des in A1 markierten Abschnittes dar. Abbildung B und C zeigen weitere Vertreter der Tumorzone. D und E weisen eine deutlich geringere intensive Rotfärbung des Zytoplasmas in der Invasionszone auf. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

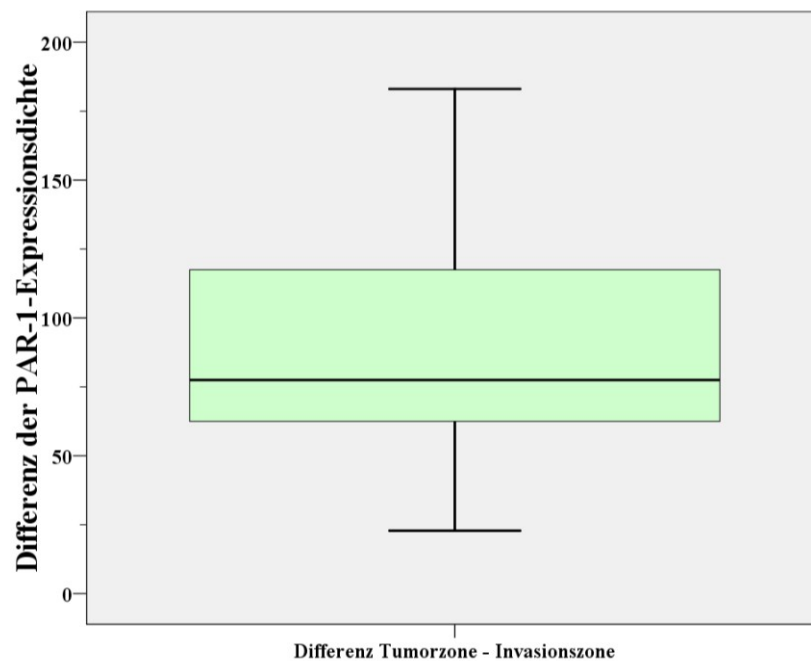


Abbildung 27: Differenzen der lichtmikroskopisch ermittelten PAR-1-Expressionsdichte im Gewebe von Tumorzone und Invasionszone bei gleicher Tumorprobe

Werte liegen deutlich im positiven Bereich, was die signifikant höhere PAR-1-Expression der Tumorzone gegenüber der Invasionszone verdeutlicht.

5.3.1.3 PAR-1-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe

Hierbei wurden die ermittelten PAR-1-Expressionsdichten der einzelnen Gewebeproben von der Tumorzone beziehungsweise der Invasionszone mit den Referenzproben bestehend aus grauer und weißer Substanz direkt miteinander verglichen. Dabei erfolgte die Signifikanzprüfung mithilfe des Mann-Whitney-Tests.

Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe bestand. Dabei zeigte die Tumorzone bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere PAR-1-Immunreaktivität gegenüber der grauen beziehungsweise der weißen Substanz. Die Invasionszone exprimierte mit $p = 0,005$ signifikant mehr PAR-1 als die graue Substanz und mit $p < 0,001$ signifikant mehr als die weiße Substanz (Tabelle 16). Die fotografische Abbildung 28 sowie die grafische Darstellung in Abbildung 29 veranschaulichen diese Aussagen.

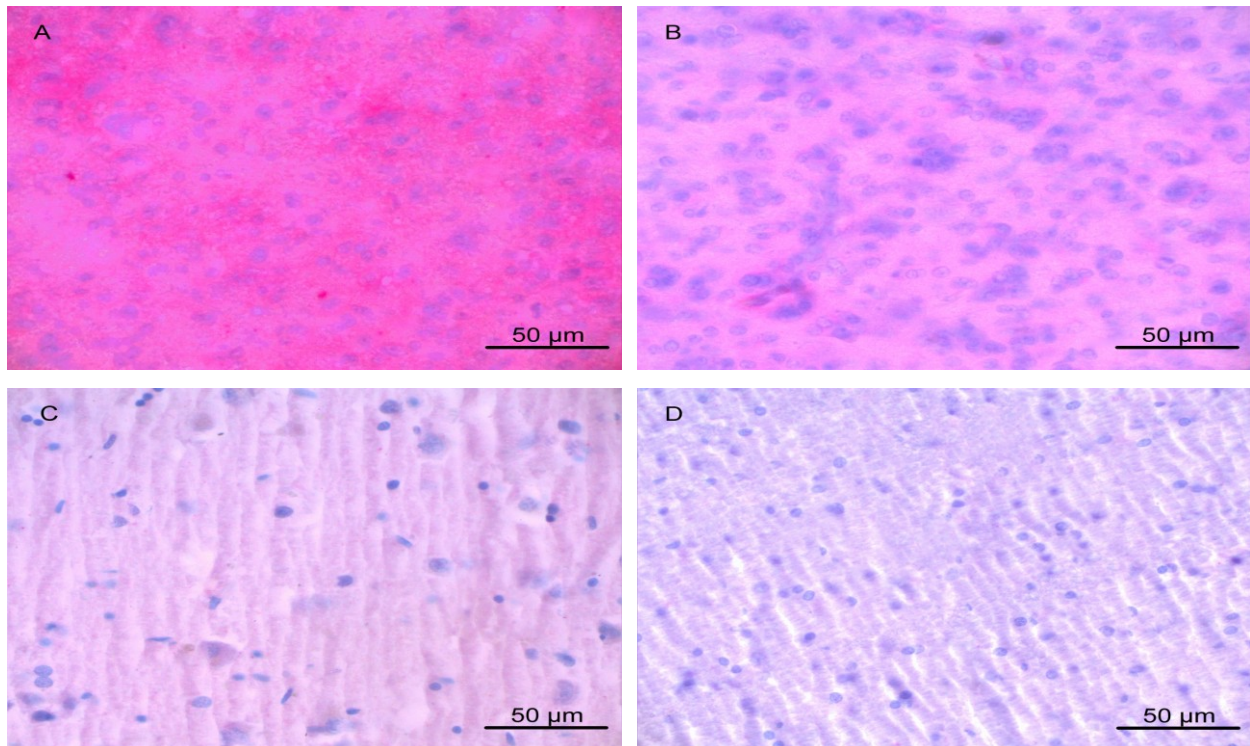


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Darstellung der PAR-1-Immunreaktivität des Tumor- und Referenzgewebes

Abgebildet sind die Tumorzone (A), die Invasionszone (B), die graue Substanz (C) und die weiße Substanz (D). Die Rotfärbung spiegelt die PAR-1-Expressionsdichte wider. Dabei ist zu sehen, dass die PAR-1-Expression in der Tumorzone über die Invasionszone und graue Substanz bis hin zur weißen Substanz stufenweise abnimmt. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

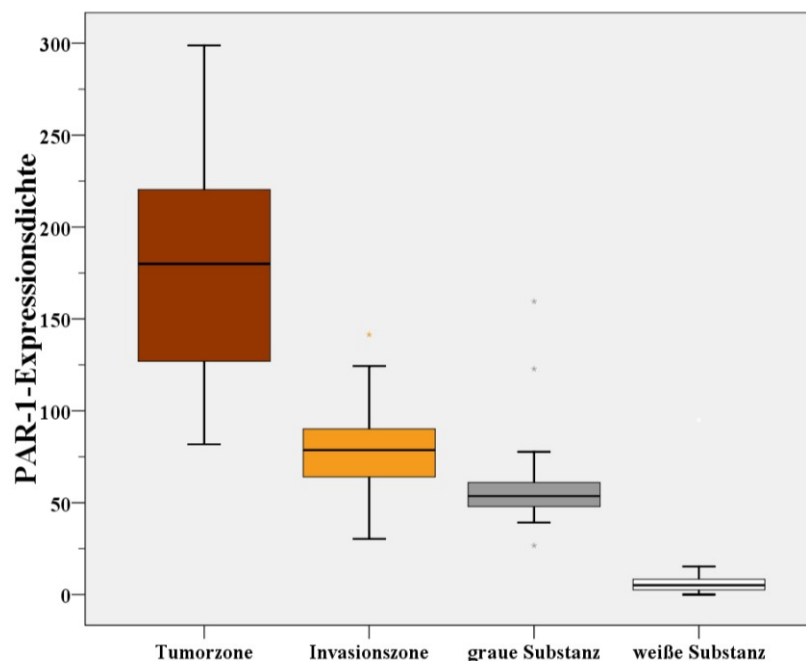


Abbildung 29: Lichtmikroskopisch ermittelte PAR-1-Expressionsdichte im Gewebe des Tumor- und Referenzgewebes

Signifikant höhere PAR-1 Expression der Tumor- und Invasionszone gegenüber der grauen und weißen Substanz. Die Sterne markieren Ausreißer.

Tabelle 15: Lichtmikroskopisch ermittelte Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte im Gewebe

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz	weiße Substanz
Mittelwert	178,39	77,92	61,37	9,55
Standardabweichung	55,60	26,06	29,74	20,53

Tabelle 16: Ergebnisse der statistischen Auswertung von der mikroskopisch ermittelten PAR-1-Expressionsdichte im Gewebe

Signifikante Unterschiede sind gelb markiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	Tumorzone	Invasionszone	graue Substanz
Invasionszone	< 0,001	x	x
graue Substanz	< 0,001	0,005	x
weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001

5.3.2 Lichtmikroskopische Bewertung der PAR-1-Expression in ein- und mehrschichtigen Gefäßen

5.3.2.1 PAR-1 in den Referenzproben

5.3.2.1.1 PAR-1-Expression der grauen Substanz

Die mehrschichtigen Gefäße innerhalb der grauen Substanz waren in 70 % der Proben durch eine PAR-1-Negativität gekennzeichnet. Sechs der insgesamt 20 Proben waren durch eine „niedrige“ PAR-1-Expressionsdichte dieses Gewebeanteils charakterisiert. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte in der grauen Substanz betrugen $1,02 \pm 1,73$ (Tabelle 17).

Einschichtige Gefäße zeichneten sich zu 55 % durch eine PAR-1-Negativität aus. Acht der 20 Proben wiesen eine „niedrige“ PAR-1-Expressionsdichte auf. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte betrugen $1,36 \pm 1,60$ (Tabelle 17).

Der geringe Unterschied der PAR-1-Expression zwischen mehr- und einschichtigen Gefäßen zeigte sich im direkten Vergleich mit dem Wilcoxon-Test bei $p = 0,544$ als nicht signifikant (Tabelle 18). Die fotografische Abbildung 30 sowie die grafische Darstellung in Abbildung 31 unterstreichen diese Aussagen.

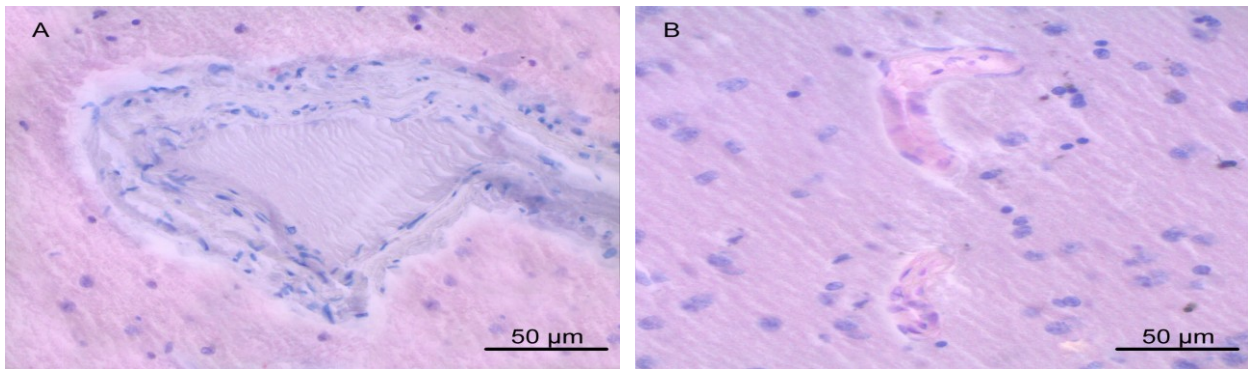


Abbildung 30: Lichtmikroskopische Darstellung der PAR-1-Immunreaktivität des Referenzgewebes von der grauen Substanz

In A ist ein mehrschichtiges Gefäß der grauen Substanz abgebildet. Es zeigt die PAR-1-Negativität auf. In Abbildung B ist ein einschichtiges Gefäß der grauen Substanz veranschaulicht. Es weist eine schwache bis negative PAR-1-Immunreaktivität auf. Die Zellkerne sind durch die Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.

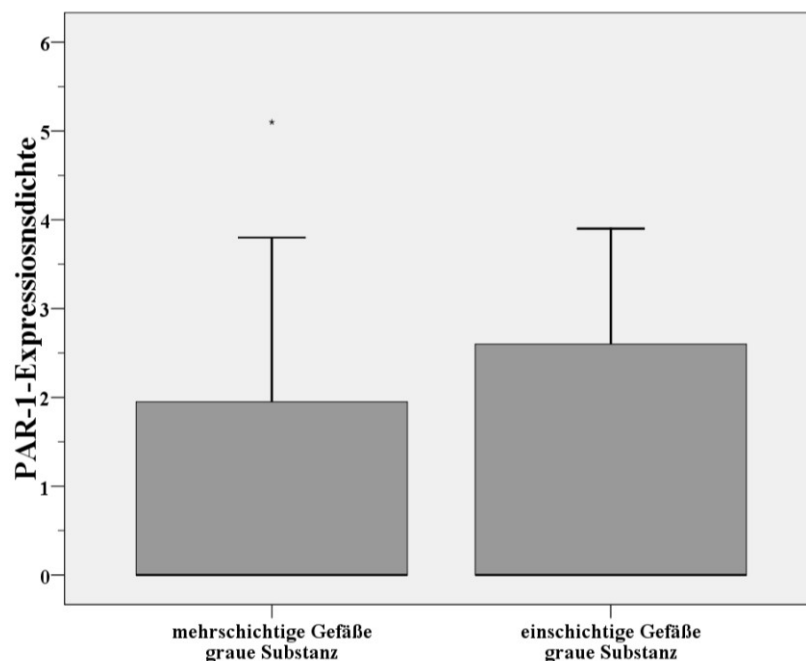


Abbildung 31: PAR-1-Expressionsdichte von mehr- und einschichtigen Gefäßen der grauen Substanz des Referenzgewebes

Der Median liegt sowohl bei den mehrschichtigen als auch bei den einschichtigen Gefäßen bei Null, was bedeutet, dass die Mehrzahl der Proben in beiden Fällen PAR-1-negativ ist. Die Expressionsdichte PAR-1-positiver Proben liegt bei beiden im „niedrigen“ Bereich. Signifikante Unterschiede zwischen mehr- und einschichtigen Gefäßen in der grauen Substanz des Referenzgewebes sind anhand des Wilcoxon-Tests nicht nachgewiesen.

5.3.2.1.2 PAR-1-Expression der weißen Substanz

Die mehrschichtigen Blutgefäße der weißen Substanz waren in 90 % der Referenzproben durch eine PAR-1-Negativität charakterisiert. Zwei der 20 Proben wiesen eine „niedrige“ PAR-1-Expressionsdichte auf. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung betrug $0,20 \pm 0,64$ (Tabelle 17).

5.3.2.1.3 Vergleich zwischen der PAR-1-Expression in grauer und weißer Substanz

In der Analyse mit dem Wilcoxon-Test von mehrschichtigen Gefäßen der grauen und weißen Substanz konnte bei $p = 0,063$ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei der Betrachtung des direkten Vergleiches von mehrschichtigen Blutgefäßen der grauen Substanz mit den einschichtigen Blutgefäßen der weißen Substanz war bei $p = 0,094$ ebenfalls keine Signifikanz eruierbar. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von 0,008 war eine signifikant höhere PAR-1-Expressionsdichte einschichtiger Blutgefäße der grauen Substanz, gegenüber den einschichtigen Gefäßen der weißen Substanz zu verzeichnen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,006$ ergab sich eine signifikant höhere PAR-1-Immunreaktivität der einschichtigen Gefäße der grauen Substanz gegenüber den mehrschichtigen Gefäßen der weißen Substanz (Tabelle 18). Das Diagramm in Abbildung 34 veranschaulicht das Ergebnis.

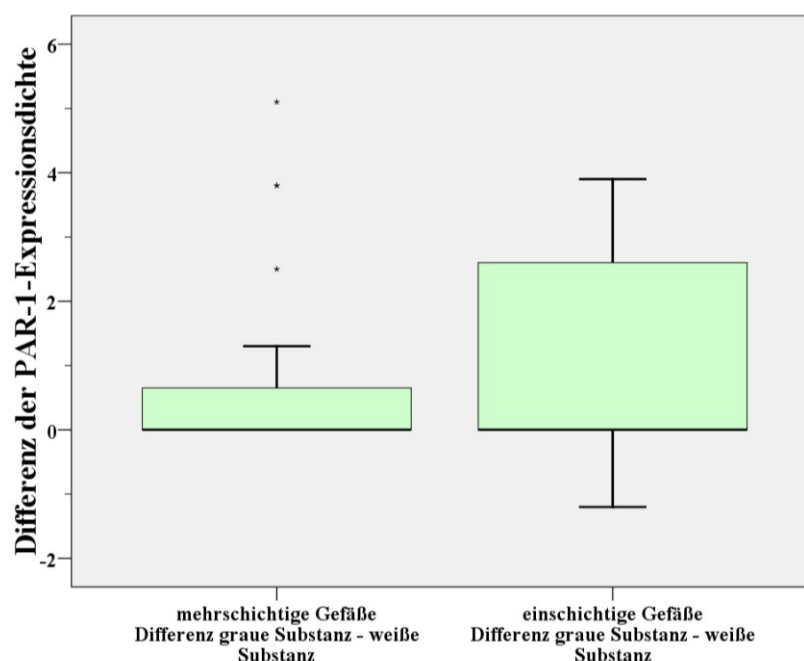


Abbildung 34: Differenzen der lichtmikroskopisch ermittelten PAR-1-Expressionsdichte in mehr- und einschichtigen Gefäßen der grauen und weißen Substanz bei gleicher Referenzprobe

Der Median, der in beiden Darstellungen bei Null liegt, zeigt an, dass in der Mehrzahl der Referenzproben keine PAR-1-Expressionsunterschiede zwischen den Blutgefäßen der grauen und weißen Substanz bestanden. Anhand der Ausdehnung der Boxplots in den positiven Bereich ist erkennbar, dass einige Proben höhere Expressionsdichtewerte in den Gefäßen der grauen Substanz als in denen der weißen Substanz aufwiesen. Ein signifikanter Unterschied anhand des Wilcoxon-Tests konnte jedoch nur bei der Analyse der einschichtigen Gefäße der grauen Substanz mit den mehr- und einschichtigen Gefäßen der weißen Substanz festgestellt werden. Die Sterne markieren Ausreißer.

Tabelle 17: Lichtmikroskopisch ermittelte Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte in mehr- und einschichtigen Gefäßen der grauen und weißen Substanz

	mehrschichtige Gefäße graue Substanz	mehrschichtige Gefäße weiße Substanz	einschichtige Gefäße graue Substanz	einschichtige Gefäße weiße Substanz
Mittelwert	1,02	0,20	1,36	0,26
Standardabweichung	1,73	0,64	1,60	1,14

Tabelle 18: Ergebnisse der statistischen Auswertung von der mikroskopisch ermittelten PAR-1-Expressionsdichte in mehr- und einschichtigen Gefäßen der grauen und weißen Substanz

Signifikante Unterschiede sind gelb markiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	mehrschichtige Gefäße graue Substanz	einschichtige Gefäße graue Substanz	mehrschichtige Gefäße weiße Substanz
einschichtige Gefäße graue Substanz	0,544	x	x
mehrschichtige Gefäße weiße Substanz	0,063	0,006	x
einschichtige Gefäße weiße Substanz	0,094	0,008	1,000

5.3.2.2 PAR-1 in Glioblastomen

5.3.2.2.1 PAR-1-Expression der Tumorzone

Bei der Analyse der mehrschichtigen Blutgefäße waren alle 56 Präparate der Tumorzone PAR-1-positiv. Davon war in 15 Proben eine „sehr hohe“ PAR-1-Expressionsdichte vorhanden. 22 der 56 Proben besaßen eine „hohe“ Expressionsdichte des Antigens. 16 Tumorzonen der Glioblastome waren durch eine „mittlere“ PAR-1-Expressionsdichte charakterisiert. In drei Fällen war sogar eine „niedrige“ Expressionsdichte des Antigens auszumachen. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung betrug $146,85 \pm 56,50$ (Tabelle 19).

Einschichtige Blutgefäße der Tumorzone wiesen in 100 % der Proben eine PAR-1-Positivität auf. In 31 Präparaten lag die PAR-1-Expressionsdichte im „sehr hohen“ und in zwölf Fällen im „hohen“ Bereich. Eine „mittlere“ Expressionsdichte des Antigens war in 13 Proben zu verzeichnen. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung betrug $175,63 \pm 54,15$ (Tabelle 19).

Beim direkten Vergleich der mehr- und einschichtigen Gefäße der Tumorzone anhand des Wilcoxon-Tests ergab sich bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere PAR-1-Expressionsdichte der

einschichtigen Blutgefäße gegenüber den mehrschichtigen Gefäßen (Tabelle 20). Die fotografische Abbildung 35 und die grafische Darstellung 36 veranschaulichen dieses Ergebnis.

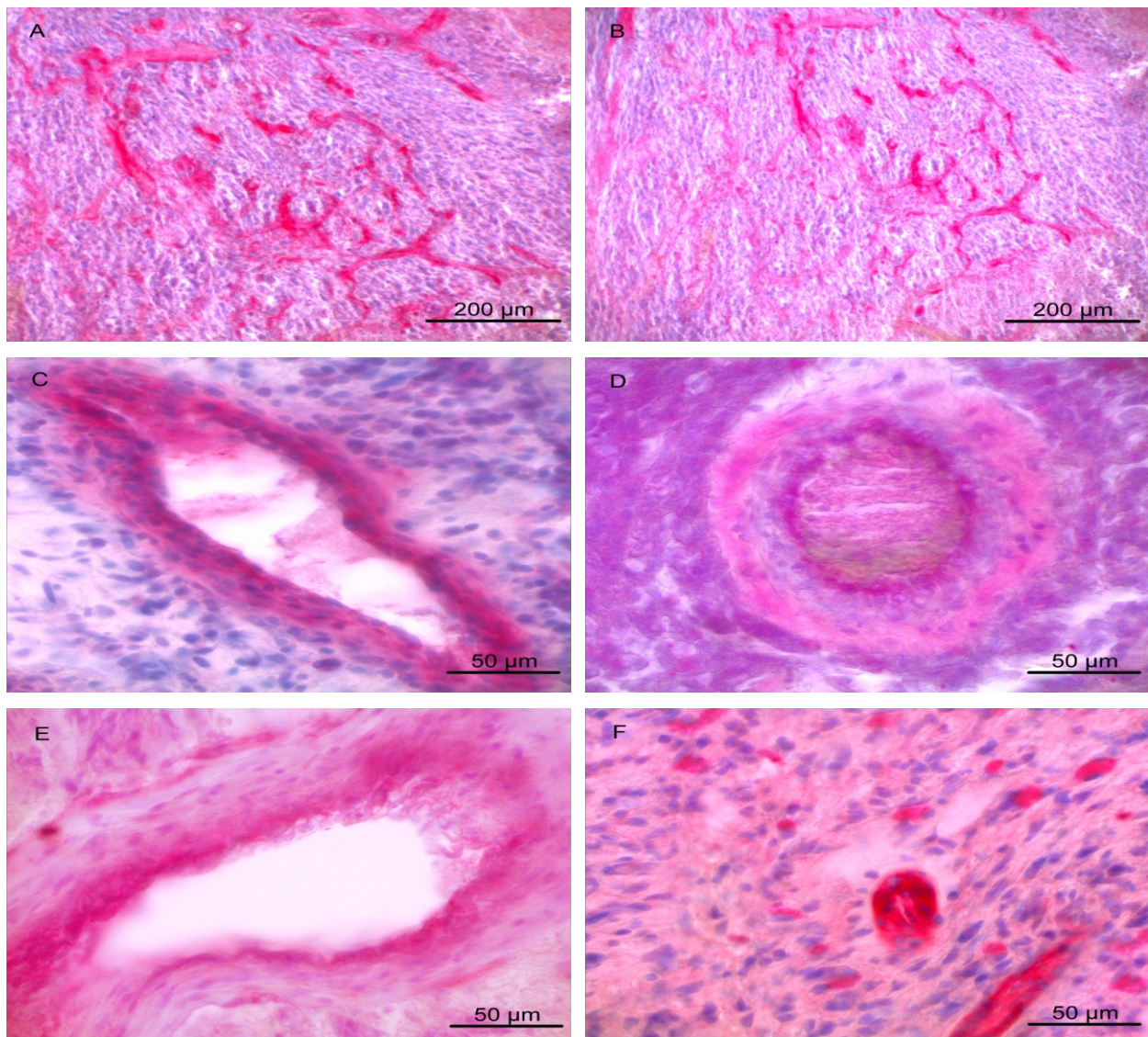


Abbildung 35: Lichtmikroskopische Darstellung der PAR-1-Immunreaktivität der Tumorzone

In A und B sind mehr- und einschichtige Blutgefäße bei einer großen Auflösung abgebildet. Abbildung C, D und E zeigen eine moderate bis starke Färbung der Endothelschicht von mehrschichtigen Gefäßen der Tumorzone. In Abbildung F ist die starke Färbung der einschichtigen Gefäße der Tumorzone veranschaulicht.

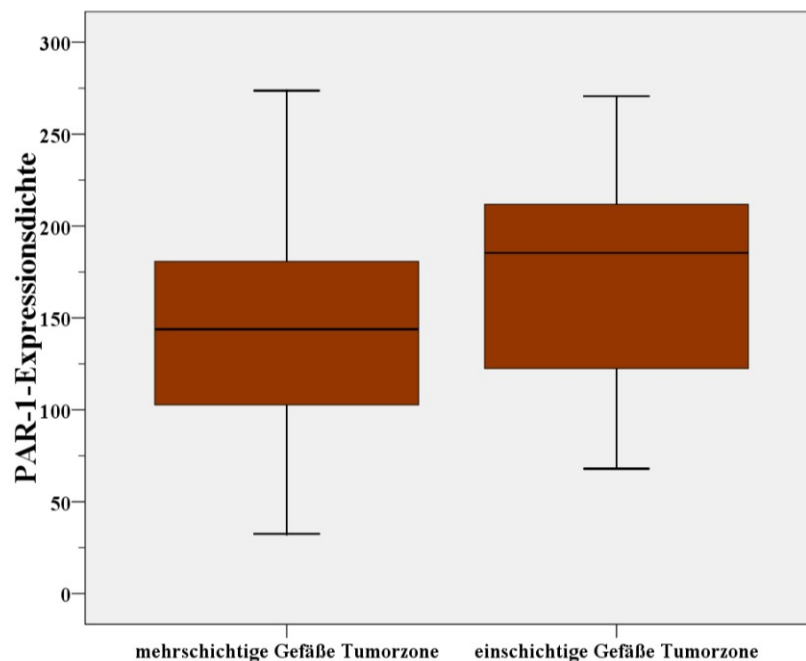


Abbildung 36: PAR-1-Expressionsdichte der mehr- und einschichtigen Blutgefäße der Tumorzone

Der Median zeigt an, dass bei den mehr- und einschichtigen Blutgefäßen eine deutliche PAR-1-Positivität vorhanden war. Die PAR-1-Expressionsdichte lag in beiden Fällen vorwiegend im „sehr hohen“ und „hohen“ Bereich. Dennoch zeigte der Wilcoxon-Test, dass die einschichtigen Blutgefäße signifikant mehr PAR-1 exprimieren als die mehrschichtigen Gefäße der Tumorzone.

5.3.2.2.2 PAR-1-Expression der Invasionszone

Von den untersuchten 56 Glioblastomen enthielten 28 Proben eine Invasionszone. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der mehrschichtigen Blutgefäße in der Invasionszone wiesen drei Präparate eine „hohe“ und 13 Proben eine „mittlere“ PAR-1-Expressionsdichte auf. Hingegen war in zwölf Fällen eine „niedrige“ Expressionsdichte des Antigens vertreten. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung betrug $70,86 \pm 39,37$ (Tabelle 19).

Bei den einschichtigen Gefäßen waren zwei der 28 Proben durch eine „sehr hohe“ PAR-1-Expressionsdichte charakterisiert. Weiterhin konnte in vier Proben eine „hohe“ und in 14 Präparaten eine „mittlere“ PAR-1-Immunreaktivität nachgewiesen werden. In weiteren acht Fällen zeigt sich eine „niedrige“ Expressionsdichte des Antigens. Der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung betrug $97,81 \pm 49,03$ (Tabelle 19).

Im Vergleich der mehr- und einschichtigen Gefäße der Invasionszone wurde im Wilcoxon-Test bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere PAR-1-Expressionsdichte der einschichtigen Gefäße gegenüber den mehrschichtigen festgestellt (Tabelle 20). Die Abbildungen 37 und 38 veranschaulichen die Aussage.

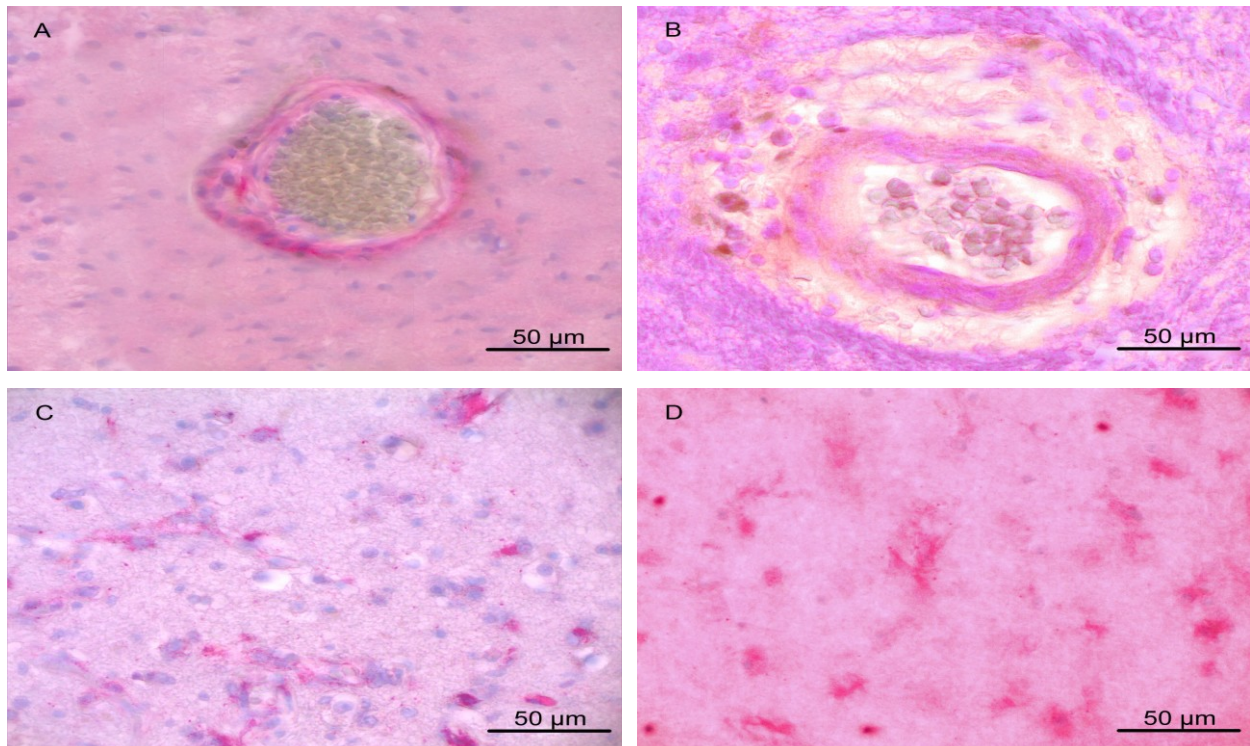


Abbildung 37: Lichtmikroskopische Darstellung der PAR-1-Immunreaktivität der Invasionszone

A und B zeigen schwach bis moderat gefärbte mehrschichtige Gefäße der Invasionszone. C und D veranschaulichen Beispiel von modert bis stark gefärbten einschichtigen Blutgefäßen innerhalb der Invasionszone.

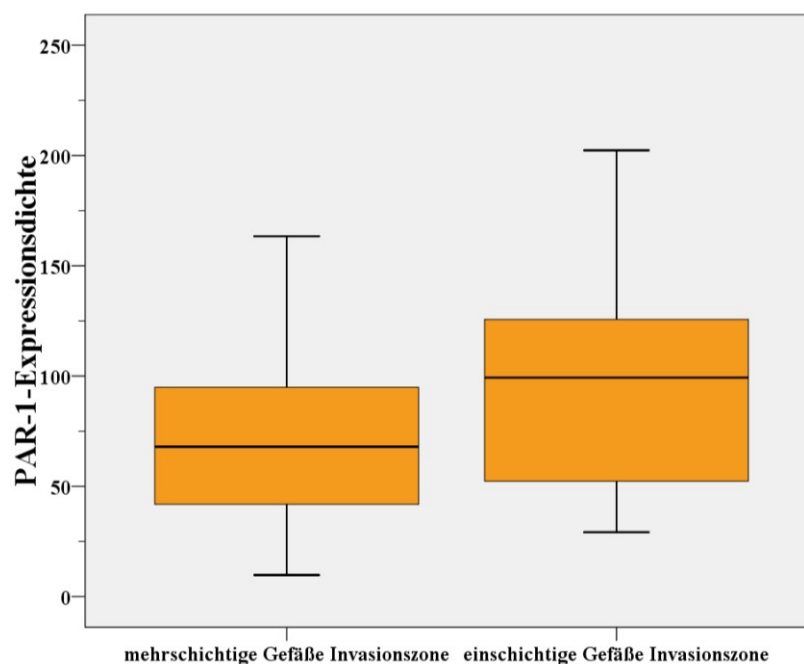


Abbildung 38: PAR-1-Expressionsdichte der mehr- und einschichtigen Blutgefäße der Invasionszone

Der Median zeigt an, dass die mehr- und einschichtigen Gefäße der Invasionszone eine deutliche PAR-1-Positivität aufwiesen. Die PAR-1-Expressionsdichte lag in beiden Fällen vorwiegend im „mittleren“ und „niedrigen“ Bereich. Dennoch zeigte der Wilcoxon-Test, dass die einschichtigen Blutgefäße signifikant mehr PAR-1 exprimieren als die mehrschichtigen Gefäße der Invasionszone.

5.3.2.2.3 Vergleich zwischen der PAR-1-Expression der Tumor- und Invasionszone

Die PAR-1-Expressionsdichte der Blutgefäße von Tumor- und Invasionszone wurde anhand des Wilcoxon-Tests auf Signifikanz geprüft. Die mehrschichtigen Gefäße der Tumorzone exprimierten bei $p < 0,001$ signifikant mehr PAR-1 als die mehrschichtigen Gefäße der Invasionszone. Beim Vergleich der einschichtigen Gefäße zwischen Tumor- und Invasionszone war bei $p < 0,001$ ebenfalls eine signifikant höhere PAR-1-Expression der Tumorzone, gegenüber der Invasionszone zu verzeichnen. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ war die Expression von PAR-1 in den mehrschichtigen Gefäßen der Tumorzone signifikant höher als in den einschichtigen Gefäßen der Invasionszone. Auch beim Vergleich von einschichtigen Gefäßen der Tumorzone mit mehrschichtigen Gefäßen der Invasionszone, war bei $p < 0,001$ eine signifikant höhere PAR-1-Expression der einschichtigen Gefäße der Tumorzone gegenüber den mehrschichtigen Gefäßen der Invasionszone zu verzeichnen (Tabelle 20). Das Diagramm in Abbildung 39 veranschaulicht dieses Ergebnis.

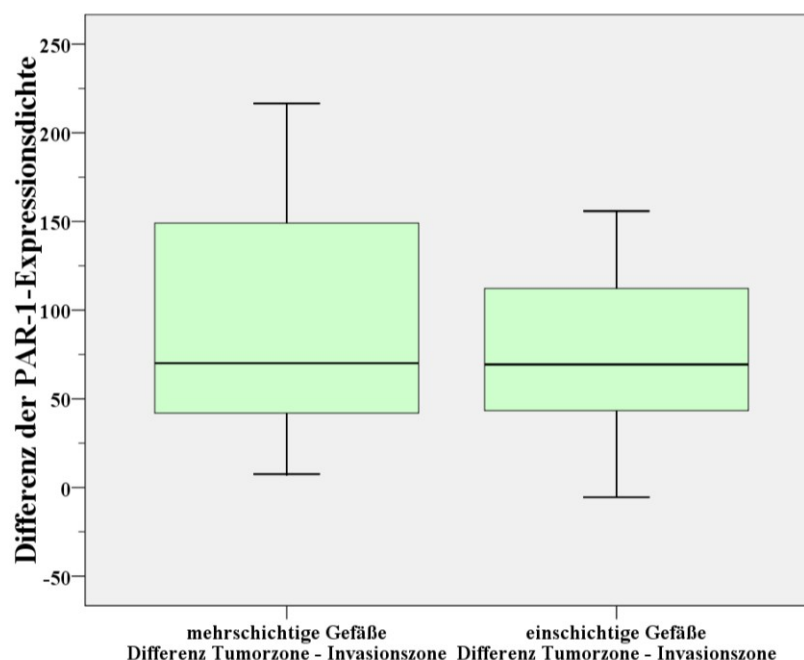


Abbildung 39: Differenz der PAR-1-Expressionsdichte der mehr- und einschichtigen Blutgefäße von Tumorzone und Invasionszone der jeweils gleichen Tumorprobe

Der Median liegt in beiden Darstellungen über Null, was veranschaulicht, dass in den Tumorproben PAR-1-Expressionsunterschiede zwischen den Blutgefäßen der Tumorzone und Invasionszone bestanden. Anhand der Ausdehnung der Boxplots in den positiven Bereich ist erkennbar, dass viele Proben höhere Expressionsdichtewerte in den Gefäßen der Tumorzone als in denen der Invasionszone aufwiesen. Der signifikante Unterschied war im Wilcoxon-Tests sowohl für die mehrschichtigen als auch für die einschichtigen Gefäße signifikant.

Tabelle 19: Lichtmikroskopisch ermittelte Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung der PAR-1-Expressionsdichte in mehr- und einschichtigen Gefäßen der Tumor- und Invasionszone

	mehrschichtige Gefäße Tumorzone	mehrschichtige Gefäße Invasionszone	einschichtige Gefäße Tumorzone	einschichtige Gefäße Invasionszone
Mittelwert	146,85	70,86	175,63	97,81
Standardabweichung	56,50	39,37	54,15	49,03

Tabelle 20: Ergebnisse der statistischen Auswertung von der mikroskopisch ermittelten PAR-1-Expressionsdichte in mehr- und einschichtigen Gefäßen der Tumor- und Invasionszone

Signifikante Unterschiede sind gelb markiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	mehrschichtige Gefäße Tumorzone	einschichtige Gefäße Tumorzone	mehrschichtige Gefäße Invasionszone
einschichtige Gefäße Tumorzone	< 0,001	x	X
mehrschichtige Gefäße Invasionszone	< 0,001	< 0,001	X
einschichtige Gefäße Invasionszone	< 0,001	< 0,001	< 0,001

5.3.2.3 PAR-1-Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe

Die PAR-1-Positivität war in den Gefäßen der grauen und weißen Substanz des Referenzgewebes in einem deutlich geringeren Anteil vertreten als in den Blutgefäßen der Tumor- und Invasionszone des Tumorgewebes. Weiterhin ergaben sich Unterschiede in der Höhe der PAR-1-Expressionsdichte. Bei der Signifikanzprüfung unter Zuhilfenahme des Mann-Whitney-Tests zeigte sich eine signifikant höhere PAR-1-Expressionsdichte der mehr- und einschichtigen Gefäße der Tumorzone gegenüber den entsprechenden Gefäßen der grauen und weißen Substanz des Referenzgewebes. Auch die PAR-1-Expressionsdichte mehr- und einschichtiger Blutgefäße der Invasionszone war signifikant höher als die der grauen und weißen Substanz. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p war für all diese beschriebenen Ergebnisse < 0,001 (Tabelle 21). Die Abbildung 40 vermittelt einen Eindruck dieser Aussagen.

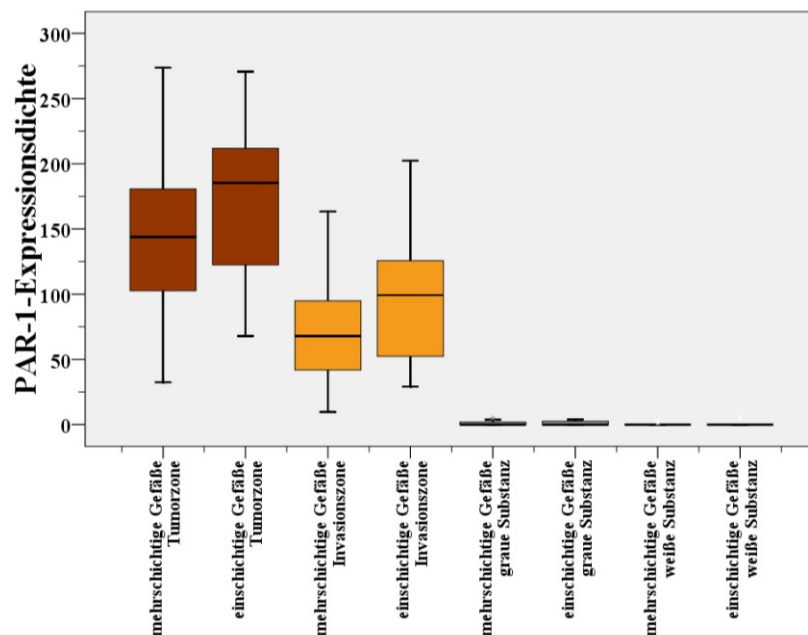


Abbildung 40: PAR-1-Expressionsdichte der mehr- und einschichtigen Blutgefäße von Glioblastom- und Referenzproben

Das Diagramm zeigt, dass die PAR-1-Expressionsdichte der mehr- und einschichtigen Gefäße von Tumor- und Invasionszone deutlich über denen der grauen und weißen Substanz liegen. Die Unterschiede waren im Mann-Whitney-Test signifikant. Die Sterne markieren Ausreißer.

Tabelle 21: Ergebnisse der statistischen Auswertung der PAR-1-Expressionsdichte von mehr- und einschichtigen Gefäßen der Glioblastom- und Referenzproben

Signifikante Unterschiede sind gelb markiert und der angegebene Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

	mehrschichtige Gefäße Tumorzone	einschichtige Gefäße Tumorzone	mehrschichtige Gefäße Invasionszone	einschichtige Gefäße Invasionszone
mehrschichtige Gefäße graue Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
einschichtige Gefäße graue Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
mehrschichtige Gefäße weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
einschichtige Gefäße weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

5.3.3 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Analyse der PAR-1-Expression

Es werden im folgenden Abschnitt die wichtigsten Ergebnisse aus der PAR-1-Expressionsanalyse zusammengefasst.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung des Tumor- und Referenzgewebes konnte gezeigt werden, dass die Tumorzone die signifikant höchste PAR-1-Expression aufwies. Die Invasionszone ließ zwar eine signifikant höhere PAR-1-Expression gegenüber der grauen Substanz erkennen, jedoch eine deutlich geringere in Bezug zur Tumorzone. Die weiße Substanz zeigte von allen Gewebetypen die signifikant geringste PAR-1-Expressionsdichte.

In der lichtmikroskopischen Analyse der Gefäße des Tumor- und Referenzgewebes konnte die höchste PAR-1-Expression in den mehr- und einschichtigen Gefäßen der Tumorzone gezeigt werden. Wobei in den einschichtigen Gefäßen der Tumorzone eine signifikant höhere PAR-1-Expressionsdichte als in den mehrschichtigen Gefäßen vertreten war. Die mehr- und einschichtigen Gefäße der Invasionszone wiesen eine deutlich höhere PAR-1-Expression als mehr- und einschichtige Gefäße der grauen und weißen Substanz auf, jedoch eine signifikant geringere als die der Tumorzone. Auch hier exprimierten die einschichtigen Gefäße mehr PAR-1 als die mehrschichtigen Blutgefäße dieser Gewebezone. Die geringste PAR-1-Expressiondichte, war in der grauen und weißen Substanz anzutreffen. Hier waren bis auf die einschichtigen Gefäße der grauen Substanz gegenüber mehr- und einschichtigen Gefäßen der weißen Substanz, keine signifikanten Unterschiede zwischen und innerhalb dieser zwei Gewebetypen auszumachen.

6. Diskussion

6.1 Einführung

Glioblastome sind sehr aggressive Tumore, die sich durch verschiedene histopathologische Eigenschaften, wie zellulären Polymorphismus, Kernatypien, erhöhte pathologische Mitoserate, Thrombenbildung, Mikrogefäßproliferation und Nekrosen auszeichnen (Kleihues und Cavenee 2000, Reifenberger et al. 2006).

Im Rahmen der Tumorprogression beziehungsweise Tumordinvasion werden zahlreiche Aspekte beleuchtet und diskutiert. Unter anderem sind Zelladhäsionsmoleküle (CAM) an den Prozessen der Zellproliferation, -migration und -invasion ins umliegende Gehirngewebe wesentlich beteiligt (Edvardsen et al. 1994). Einen bedeutenden Vertreter stellt dabei das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) dar, welches ein Immunglobulin-artiges Molekül des Nervensystems ist (Ronn et al. 1998, Crossin und Krushel 2000). Es beeinflusst die Migration, Differenzierung und Proliferation von Gliazellen und Neuronen (Walmod et al. 2004). Bei der Induktion von Tumorwachstum und Metastasierung spielt auch die pathologische Gefäßproliferation eine entscheidende Rolle (Schlegel et al. 2003). Das Glykoprotein CD 31, was wie NCAM ein Immunglobulin-ähnliches Molekül ist, trägt bei diesen tumorbiologischen Vorgängen eine wesentliche Funktion (Newman 1997, Zhou et al. 1999). Daneben hat Thrombin als Serinprotease über die Aktivierung des Protease-aktivierenden-Rezeptors PAR-1 einen großen stimulatorischen Einfluss auf die Tumorangiogenese (Tsopanoglou und Maragoudakis 2007).

Bei dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich eine Tumorgrenze innerhalb des Tumorgewebes erkennen lässt. Grundsätzlich muss gesagt werden, dass eine solche in der Literatur nicht beschrieben wird. Jedoch ist diese scheinbare Abgrenzung zum peritumoralen Gewebe aufgrund der unterschiedlichen molekularen Eigenschaften von Tumorzone und Invasionszone möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden 56 Proben humaner Glioblastome und 20 Proben des tumorfreien Referenzgewebes der grauen und weißen Substanz immunhistochemisch auf die Expression von NCAM-140 und PAR-1 sowie die Gefäßdichte durch CD 31 hin untersucht. Die Auswertung erfolgte immer lichtmikroskopisch und bei NCAM-140 auch makroskopisch. Dabei wurden Invasionszone und Tumorzone innerhalb des Tumorgewebes getrennt voneinander analysiert und beurteilt. Die Bewertung der Antigenexpression von NCAM-140 und PAR-1 sowie die Erhebung der Gefäßdichte bei CD 31 in den einzelnen Präparaten erfolgte subjektiv. Die erhobenen Daten wurden statistisch erfasst und anschließend einer Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen unterzogen.

6.2 Bewertung der verwendeten Methoden

6.2.1 Verwendung von Autopsiegewebe als tumorfreies Referenzgewebe

Bei den in der Arbeit verwendeten 20 Referenzproben der grauen und weißen Substanz handelte es sich ausschließlich um Autopsiegewebe des Institutes für Pathologie in Jena. Eine operative Gewinnung von tumorfreien Hirngewebe ist ethisch nicht vertretbar und wird daher nicht angewandt. Jedoch wird das Autopsiematerial wie das tumorhaltige Operationsmaterial auch in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dies dient der Unterbrechung der postmortal einsetzenden Autolyse von einzelnen Proteinen und ein aktiver Abbau durch zelleigene Enzyme kann dadurch verhindert werden (Lüllmann-Rauch 2006, Riede et al. 2004). Bei dem Autopsiematerial muss daher davon ausgegangen werden, dass bis zum Zeitpunkt der Fixierung ein Verlust von Proteinen stattgefunden hat.

NCAM-140 konnte trotz dieser Prozesse in der grauen Substanz bei allen Referenzproben in signifikant höherem Maße nachgewiesen werden als in der Tumorzone und Invasionszone des Tumorgewebes. Auch die weiße Substanz exprimierte mehr NCAM-140 als die Tumorzone.

Bei CD 31 und PAR-1 zeigte die graue und weiße Substanz in Bezug auf die Tumorzone eine deutlich geringere Expression, jedoch wies die graue Substanz von CD 31 eine höhere Expression auf als die Invasionszone. Trotz alledem kann ein relevanter Proteinverlust aufgrund von Autolysevorgängen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Dennoch handelt es sich bei NCAM-140, CD 31 und PAR-1 um die gleichen Referenzproben von ein und demselben Autopsiematerial. Weiterhin zeigte sich bereits in der Invasionszone eine deutlich geringere Expression beider Antigene (CD 31 und PAR-1) als in der Tumorzone. Von daher liegen die Unterschiede eher in den tumorbiologischen Prozessen begründet. Es kann damit von einer nicht experimentell relevanten Autolyse bei allen Proben ausgegangen werden und das in dieser Arbeit verwendete Referenzgewebe kann mit einer entsprechenden signifikanten Aussagekraft verwendet werden.

6.2.2 Bewertung der makroskopischen Analyse

Bei der Analyse der NCAM-140-Expression wurde zunächst eine Betrachtung mit dem bloßen Auge vorgenommen. Die Anwendung dieser Methode wurde bereits in drei weiteren Untersuchungen der Klinik für Neurochirurgie Jena sowie in der Publikation von Duenisch et al. eingesetzt und deren intraoperative Einsatzfähigkeit diskutiert, beziehungsweise deren Aussagefähigkeit gezeigt (Kellmann 2010, Koblitz 2004, Dünisch 2009, Duenisch et al. 2011). Man erhält schnell und effizient eine grobe Orientierung bezüglich des Vorhandenseins und der Ausdehnung von Tumor- und Invasionszone. Jedoch ist bei der Betrachtung mit dem

menschlichen Auge in Hinsicht auf das begrenzte Auflösungsvermögen keine Differenzierung auf zellulärer Ebene möglich und ersetzt damit nicht die lichtmikroskopische Beurteilung.

CD 31 und PAR-1 kommen im Gegensatz zu NCAM-140 lokal begrenzt vor und nicht so flächendeckend, daher war hier keine Betrachtung auf makroskopischer Ebene möglich.

6.2.3 Bewertung der lichtmikroskopischen Analyse

In der Forschung ist ein gebräuchliches Verfahren zur Analyse der Antigenexpression nach immunhistochemischer Darstellung die lichtmikroskopische Beurteilung der Immunreaktivität (Kleinschmidt-DeMasters et al. 1999, Tews und Nissen 1998, Duenisch et al. 2011).

Bei der lichtmikroskopischen Bewertung der Antigenexpression stehen dabei für die semiquantitative Untersuchung zwei unterschiedliche Auswertungskriterien zur Verfügung. In der Arbeit von Tews und Nissen sowie in der Arbeitsgruppe von Kleinschmidt-DeMasters et al. wurde zum Beispiel die NCAM-Expression untersucht.

Dabei erfolgt bei Tews und Nissen die Auswertung anhand des prozentualen Anteils der Zellen, die eine positive Immunreaktion aufzeigten. Die Immunreaktion wurde dabei in fünf Stufen unterteilt. Hierbei wurde eine negative Immunreaktion mit 0 %, eine schwach positive mit 1-25 %, eine mäßig positive mit 26-50 %, eine stark positive mit 51-75 % und eine sehr stark positive mit 76-100 % bewertet (Tews und Nissen 1998).

In der Arbeit von Kleinschmidt-DeMasters et al. erfolgt die Beurteilung der Antigenexpression hingegen anhand der Färbintensität von Zellen mit einer positiven Immunreaktion. Dabei wurde die Einteilung über eine fünfstufige Skala mit negativ, schwach positiv, mäßig positiv, stark positiv, sehr stark positiv vorgenommen (Kleinschmidt-DeMasters et al. 1999).

Duenisch verwendete zur Analyse der Antigenexpression von NCAM-140 einen Kompromiss aus beiden eben angesprochenen Verfahren. Er traf zunächst eine Einteilung über den prozentualen Anteil der im Gesichtsfeld positiv gefärbten Zellen und erfasste zusätzlich mit einer Skala von 0 bis 3 in welcher Farbintensität diese Immunreaktion vorhanden war. Letztlich wurden die paarweise erfassten Werte multipliziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass eine zu starke Betonung der Intensität der Immunreaktion verhindert wird (Duenisch et al. 2011).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde für die Expressionsanalyse von PAR-1 und NCAM-140 das Verfahren von Duenisch et al. mit entsprechenden Skalen genutzt.

Die Expressionsanalyse von CD 31 erfolgte ähnlich der Arbeit von Yao et al. in modifizierter Art und Weise. Da CD 31 nur das Endothel von Gefäßen anfärbt, ist eine direkte Auszählung der Gefäße im mikroskopischen Bild möglich. Bei Yao wurde die mikroskopische Betrachtung beziehungsweise Zählung allerdings bei einer 200-fachen Vergrößerung durchgeführt und nicht wie in dieser Arbeit bei einer 400-fachen (Yao et al. 2005).

Damit bei allen Analysevorgängen eine Objektivität dieser primär subjektiven Untersuchungen gewahrt ist, muss die Beurteilung durch mehrere Untersucher bei der gleichen Gewebeprobe durchgeführt werden, wobei im Endresultat vergleichbare Ergebnisse erzielt werden sollten.

6.2.4 Bewertung der Differenzierung zwischen Tumor- und Invasionszone

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Glioblastomproben wurde, wenn vorhanden, eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Invasionszone vollzogen. Der Grundgedanke dabei war zum einen, dass die Tumorzellen in der Invasionszone deutlich geringer sind und damit auch der Anteil an neoplastisch unveränderten Zellen höher ist als in der Tumorzone. Hierdurch könnte ein signifikanter Expressionsunterschied in der Antigenpräsenz zwischen den beiden Arealen theoretisch verursacht sein. Zum anderen ist ein deutlicher Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und tumorfreien Referenzgewebe vorhanden. Diese Anschauungen begründen die Behauptung, dass eine Abgrenzung von der Tumorzone zum peritumoralen Gewebe anhand der unterschiedlichen Ausprägung der untersuchten Antigene möglich ist.

6.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von NCAM-140

6.3.1 Ergebnisse der makroskopischen Auswertung der NCAM-140-Expressionsanalyse

In der makroskopischen Analyse ist in allen Proben der grauen Substanz des Referenzgewebes die höchste NCAM-140-Expression nachgewiesen worden. Sowohl die Expressionsunterschiede gegenüber der weißen Substanz des Referenzgewebes als auch gegenüber der Tumor- und Invasionszone der Tumorproben waren signifikant. Die weiße Substanz der Referenzproben zeigte hingegen in Bezug auf die Tumorzone eine deutlich höhere NCAM-140-Expression, jedoch im Vergleich zur Invasionszone und der grauen Substanz eine signifikant niedrigere NCAM-140-Expression. Der wahrscheinliche Grund für den beträchtlichen Unterschied der NCAM-140-Expression der weißen Substanz gegenüber der grauen Substanz des Referenzgewebes liegt zum wesentlichen Teil im anatomischen Aufbau des gesunden Hirngewebes begründet. Bekanntermaßen wird die graue Substanz aus den Perikaryen der zentralnervösen Neuronen gebildet und die weiße Substanz vorwiegend aus der Masse von Axonen und Gliazellen (Trepel 2008). In der Arbeit von Ronn et al. wurde gezeigt, dass NCAM in Neuronen stärker exprimiert wird als in Gliazellen (Ronn et al. 1998). Auch die Arbeitsgruppe um Tews und Nissen belegte, dass in Neuronen eine verstärkte NCAM-Expression vertreten war. Hingegen war in Gliazellen eine deutlich geringere bis hin zu einer vollständigen Negativierung der Expression von NCAM vorhanden (Tews und Nissen 1998). Durch diese Forschungsergebnisse ist der enorme Expressionsunterschied zwischen grauer und weißer Substanz erklärbar.

Die Tumorzone wies bei der makroskopischen Auswertung in über 39 % eine vollständige NCAM-140-Negativierung beziehungsweise in knapp über 60 % eine sehr schwache NCAM-140-Expression auf. Sie zeichnete sich somit durch die signifikant geringste NCAM-140-Expression gegenüber Invasionszone und grauer und weißer Substanz des Referenzgewebes aus. Die Invasionszone wies hingegen in der makroskopischen Analyse im überwiegenden Teil eine mittlere NCAM-140-Expression auf. Die Zellen der Invasionszone zeigten damit eine signifikant höhere Expression von NCAM-140 gegenüber der Tumorzone auf. In früheren Untersuchungen der neurochirurgischen Klinik wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. In der Arbeit von Koblitz und Dünisch konnte ebenfalls schon gezeigt werden, dass die Tumorzone die geringste NCAM-140-Expression gegenüber allen anderen untersuchten Geweben - Invasionszone, weißer und grauer Substanz - aufzeigte (Koblitz 2004, Dünisch 2009). Allerdings kam in der Arbeit von Kellmann eine widersprüchliche Anschauung auf. Hier war die signifikant geringste NCAM-140-Expression, in der weißen Substanz des Referenzgewebes zu beobachten (Kellmann 2010). Unterschiede bei der Herstellung der Präparate bestanden nicht. Jedoch könnten Autolysevorgänge in den Referenzproben der weißen Substanz von Kellmann doch zu einem relevanten Proteinverlust geführt haben und damit die signifikante Aussagekraft beeinflussen. Für die Klärung der Frage, warum die Invasionszone mehr NCAM-140 exprimiert als die Tumorzone und die tumorfreie weiße Substanz, gibt es verschiedene Interpretationsmöglichkeiten. Zum einen könnte es möglich sein, dass die Invasionszone einen hohen Anteil von grauer Substanz und damit verstärkt NCAM-140-exprimierende Neuronen beinhaltet. Auf der anderen Seite könnten onkologische Prozesse zu einer veränderten Reaktivität und damit verstärkten Expression von NCAM-140 im Gliazellgewebe geführt haben. Auf jeden Fall zeigten die hier aufgeführten Ergebnisse, dass es in der Mehrzahl möglich war, anhand der NCAM-140-Expression eine Abgrenzung der Tumorzone zur Invasionszone mit dem bloßen Auge zu schaffen. Daher ist es denkbar, dass diese Methode der Abgrenzbarkeit klinische Relevanz haben könnte. Diese Verfahrensweise könnte während einer Operation genutzt werden und dem Operateur einen groben Hinweis geben, wo die Grenze zwischen Tumorzone und peritumoralen Gewebe liegt.

Letztlich muss man sagen, dass die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung im nachfolgenden Abschnitt die Resultate der makroskopischen Auswertung bestätigen.

6.3.2 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung der NCAM-140-Expressionsanalyse

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der makroskopischen Analyse von NCAM-140 erreicht werden. Auch hier wies die graue Substanz des tumorfreien Referenzgewebes die signifikant höchste NCAM-140-Expressionsdichte

gegenüber der weißen Substanz der Referenzproben und auch im Vergleich zur Tumor- und Invasionszone der tumorhaltigen Gewebeproben auf. Wiederum zeigte die weiße Substanz gegenüber der Tumorzone eine deutlich höhere, jedoch in Bezug zur Invasionszone der Tumorproben und grauen Substanz des Referenzgewebes eine signifikant geringere NCAM-140-Expression.

Die Tumorzone, der in dieser Arbeit verwendeten Glioblastomproben, veranschaulichte auch bei der lichtmikroskopischen Auswertung, dass hier die signifikant geringste Expression von NCAM-140 im Vergleich zur Invasionszone und der grauen und weißen Substanz des tumorfreien Hirngewebes zu verzeichnen war. Während die Tumorzone zu 100 % durch eine negative oder sehr geringe NCAM-140-Expression gekennzeichnet war, wies die Invasionszone in fast 93 % der Fälle eine mittlere Expression von NCAM-140 auf.

Anhand der hier aufgeführten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine stufenweise Abnahme der NCAM-140-Expression von der grauen Substanz des Referenzgewebes ausgehend über die Invasionszone bis hin zur Tumorzone des Glioblastomgewebes beobachtet werden konnte. Daher kann man die Vermutung anstellen, dass der Verlust des NCAM-140 Adhäsionsmoleküls eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression spielt.

In der Fachliteratur gibt es eine Vielzahl an Arbeiten, die sich ebenfalls mit der Expression von NCAM in Gliomen befassen. In den Arbeiten spiegeln sich die oben angeführten Ergebnisse wider. Allerdings wurde keine genaue Differenzierung zwischen Tumorzone und Invasionszone getroffen. Die Aussagen zwischen den einzelnen Publikationen sind jedoch widersprüchlich (Tews und Nissen 1998, Kleinschmidt-DeMasters et al. 1999, Sasaki et al. 1998, Huang et al. 2001, Todaro et al. 2007, Duenisch et al. 2011).

In der Arbeit von Tews und Nissen sowie bei Kleinschmidt-DeMasters konnte im Gegensatz zu anderen Publikationen kein Zusammenhang zwischen dem WHO-Grad der astrozytären Gliome und der NCAM-Expression aufgezeigt werden (Tews und Nissen 1998, Kleinschmidt-DeMasters et al. 1999). Ein möglicher Erklärungsversuch für diese Abweichungen könnte sein, dass zum Beispiel in der Arbeit von Tews und Nissen ein monoklonaler Antikörper verwendet wurde, der neben NCAM-140 auch gegen NCAM-120 und NCAM-180 gerichtet ist. Damit fand keine spezifische Selektion von NCAM-140 statt. Andererseits können die verschiedenen Subtypen von Glioblastomen (kleinzellige und fusiforme Glioblastome, Riesenzellglioblastome) unterschiedliche Molekülausstattungen besitzen, sodass es letztendlich zu einer abweichenden Expression von NCAM kommt.

Bei der Arbeitsgruppe um Sasaki wurden 23 astrozytäre Tumore mittels Western Blot und sieben dieser Tumore immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen alle drei

NCAM-Isoformen (NCAM-120, -140, -180) untersucht. Dabei konnte ein reziproker Zusammenhang zwischen WHO-Grad und NCAM-Expression aufgezeigt werden. Weiterhin zeigten drei der vier immunhistochemisch gefärbten Glioblastome eine sehr schwache NCAM-Expression (Sasaki et al. 1998).

In der Arbeit von Todaro et al. wurden 59 Gliome immunhistochemisch betrachtet. Auch hier wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der gegen alle drei Isoformen gerichtet war. Ebenfalls beschrieb er die umgekehrte Korrelation zwischen der NCAM-Expression und dem WHO-Grad von astrozytären Gliomen. Außerdem zeigten dreizehn von 37 Glioblastomen eine schwache Immunreaktivität, dass heißt, weniger als 25 % der gefärbte Zellen wiesen einen positiven Farbumschlag auf (Todaro et al. 2007).

Huang et al. untersuchten 48 Gliome auf ihre NCAM-Expression. Dabei erzielten sie das gleiche Resultat wie Sasaki et al. und Todaro et al. Bei den untersuchten Gliomen WHO-Grad IV wiesen acht von zehn keine NCAM-Expression auf (Huang et al. 2001).

Auch die Arbeitsgruppe von Duenisch et al. beschäftigte sich mit dem reziproken Zusammenhang von Malignitätsgrad der Gliome und NCAM-Expression und kam letztlich zur gleichen Aussage wie bereits schon angesprochen. Allerdings verwendeten sie für die immunhistochemischen Untersuchungen einen spezifischen polyklonalen Antikörper für NCAM-140 (Duenisch et al. 2011).

6.3.3 Darstellung der Tumorgrenze

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sowohl in der makroskopischen als auch in der lichtmikroskopischen Analyse signifikante Unterschiede bezüglich der NCAM-140-Expression zwischen der Tumorzone und der Invasionszone bei den Glioblastomproben gab. Dabei konnte das NCAM-140-negative Tumorzentrum von der deutlich NCAM-140-positiveren Invasionszone abgegrenzt werden. Für die Auswertung standen 24 der insgesamt 56 Glioblastome zur Verfügung. In Folge dessen wurde bei der lichtmikroskopischen Auswertung bei 20,8 % eine scharfe Tumorgrenze, bei 33,3 % eine diffuse Einzellinvasion und bei 45,9 % Übergangsformen von beiden festgestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Tumorgrenzformen konnte leider nicht festgestellt werden. Eine mögliche Ursache wäre, dass der Probenumfang zu gering war. Dennoch sind Tendenzen für Signifikanzen erkennbar.

Lediglich eine Publikation von Duenisch et al. beschäftigte sich neben dem reziproken Zusammenhang von Malignitätsgrad der Gliome und NCAM-Expression auch mit dem Thema der Abgrenzbarkeit der Tumorzone zum peritumoralen Hirngewebe in Glioblastomen. Dabei wurden 59 Glioblastome beleuchtet. Hierbei gelang es der Forschungsgruppe bei 43

Glioblastomen die Beschreibung einer NCAM-140-positiven peritumoralen Hirnsubstanz, welche sich zum NCAM-140-negativen Tumorzentrum der Glioblastome abgrenzen ließ. Damit wurde zum ersten Mal der Begriff für eine Invasionszone angeführt. Allerdings ist diese relative Abgrenzung bei niedriggradigeren Gliomen aufgrund einer nicht vollständigen NCAM-140-negativen Immunreaktivität nicht möglich.

In der Arbeit von Duenisch wurde ebenfalls die Tumorgrenze nach ihrer Form beurteilt. Dabei wurde eine Einteilung in eine scharfe Tumorgrenze, diffuse Einzelzellinvasion und Invasion in Form von Tumorzellnestern getroffen. Eine Überprüfung auf signifikante Unterschiede fand allerdings nicht statt (Duenisch et al. 2011). Das Merkmal einer Invasion von Tumorzellnestern wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen.

6.4 Ergebnisse der Expressionsanalyse von CD 31

Die lichtmikroskopische Analyse von CD 31 vollzog sich in den von NCAM-140 zuvor detektierten Bereichen von Tumor- und Invasionszone des Glioblastomgewebes sowie in grauer und weißer Substanz des tumorfreien Referenzgewebes. Allerdings betrachtete man hier ausschließlich die Gefäße. Da CD 31 nur das Endothel von Gefäßen anfärbt, wodurch diese allein im lichtmikroskopischen Bild sichtbar werden, kann man die Gefäße direkt auszählen. Eine Beurteilung von CD 31 im umliegenden Gewebe, im Gegensatz zu NCAM-140 und PAR-1, ist bei CD 31 nicht möglich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in allen Proben der grauen Substanz des tumorfreien Gewebes eine mittlere Gefäßdichte vorhanden war. Bei der weißen Substanz des Referenzgewebes war in 100 % der Fälle eine geringe Gefäßdichte vorhanden. Somit wies die graue Substanz eine signifikant höhere Gefäßdichte auf als die weiße Substanz.

In der Tumorzone konnte bei allen 56 Glioblastomproben eine hohe beziehungsweise sehr hohe Dichte von Gefäßen festgestellt werden. Damit lag die Gefäßdichte in der Tumorzone gegenüber der Invasionszone des Tumorgewebes und der grauen und weißen Substanz des Referenzgewebes signifikant am höchsten. In der Invasionszone war zu 68 % eine geringe und zu 29 % eine mittlere Gefäßdichte vorhanden. Interessanterweise war damit die Gefäßdichte in der Invasionszone signifikant niedriger als in der Tumorzone und grauen Substanz der Referenzproben, jedoch gegenüber der weißen Substanz deutlich höher. Eine mögliche Erklärung für die ersichtliche Diskrepanz der Gefäßdichte in der Invasionszone zum Referenzgewebe vor allem zur grauen Substanz könnte sein, dass der Anteil von weißer Substanz in der Invasionszone höher ist und damit die Expression von CD 31 in den Endothelien der Gefäße niedriger ist als in der grauen Substanz des Referenzgewebes. Denn aufgrund der

anatomischen Voraussetzung, wie bereits schon bei NCAM-140 erwähnt, besteht die weiße Substanz aus Axonen und Gliazellen, wohingegen die graue Substanz aus den Nervenzellkörpern aufgebaut ist. Dadurch wird eine unterschiedliche Blutversorgung dieser einzelnen Areale auch denkbar. Auf der anderen Seite ist der Anteil an tumorveränderten Zellen in der Invasionszone nicht so hoch wie in der Tumorzone der Glioblastome, was wiederum den Expressionsunterschied von CD 31 in den Gefäßen zwischen Invasions- und Tumorzone erklären könnte.

In verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten wurde der Zusammenhang zwischen tumorveränderten Zellen in Gliomen und Neoangiogenese beleuchtet, welche letztlich die Ergebnisse dieser Arbeit belegen (Aroca et al. 1999, Yao et al. 2005, Khattab et al. 2009, Lebelt et al. 2008). Eine Differenzierung zwischen Tumorzone und Invasionszone erfolgte in diesen jedoch nicht. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Ergebnisse überwiegend auf die Tumorzone beziehen.

In der Arbeit von Aroca et al. wurden 30 Gliome (10 Oligodendrogliome, 7 anaplastische Oligodendrogliome, 13 Glioblastome) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in den anaplastischen Oligodendrogliomen und vor allem in den Glioblastomen eine verstärkte CD 31-Expression in den endothelialen Zellen der Mikrogefäßproliferationen auftrat (Aroca et al. 1999). Khattab et al. untersuchten 45 immunhistochemisch gefärbte Gliome bezüglich einer statistisch signifikanten Korrelation zwischen der p 53- und CD 31-Expression und des entsprechenden Malignitätsgrades. Hierbei wurde ein sogenannter Labeling Index (LI) erhoben. Das Resultat zeigte, dass Glioblastome den höchsten Anteil von CD 31 exprimierten, was wiederum auf die höchste Gefäßdichte schließen lässt (Khattab et al. 2009).

Die Arbeitsgruppe um Yao analysierte 50 Gliome, wovon 29 dem WHO-Grad IV entsprachen. Die Methode der immunhistochemischen und analytischen Vorgehensweise war der in dieser Arbeit verwendeten Verfahren ähnlich. Folglich konnte auch hier gezeigt werden, dass die höchste Gefäßdichte in Glioblastomen vertreten ist. Somit konnte eine positive Korrelation zwischen Gefäßdichte und Malignitätsgrad von Gliomen aufgezeigt werden (Yao et al. 2005).

Lebelt et al., die 99 Gliome bei 23 Glioblastomen untersuchten und dabei ein ähnliches Analyseverfahren wie bei Yao anwandten, erzielten ebenfalls die Aussage, dass mit Zunahme des Malignitätsgrades auch die Gefäßdichte zunimmt. Somit ist die höchste Dichte von Gefäßen, in den Glioblastomproben zu finden (Lebelt et al. 2008).

In der biomedizinischen Fachliteratur wurde die Gefäßdichte in der grauen und weißen Substanz nach unserem bisherigen Erkenntnisstand nicht beschrieben.

6.5 Ergebnisse der Expressionsanalyse von PAR-1

Die Expressionsanalyse von PAR-1 erfolgte lichtmikroskopisch entsprechend der bei der Bewertung von NCAM-140 angewandten Methode. Neben der Tumor- und Invasionszone wurden zusätzlich noch die Endothelien von ein- und mehrschichtigen Gefäßen in den entsprechenden Geweben bewertet.

Die in dieser Arbeit verwendete graue Substanz des Referenzgewebes wies in 90 % eine geringe bis mäßige PAR-1-Expression auf. Hingegen war die weiße Substanz in 95 % der Fälle eher durch eine geringe bis vollständig negative Expression von PAR-1 gekennzeichnet. Insgesamt exprimierte die graue Substanz des Referenzgewebes einen signifikant höheren Anteil an PAR-1 als die weiße Substanz.

Die Tumorzone der 56 Glioblastomproben zeigte die mit Abstand signifikant höchste PAR-1-Expression von allen anderen untersuchten Geweben auf, da bei 77 % eine sehr hohe bis hohe und lediglich bei 23 % eine mittlere PAR-1-Immunreaktivität auftrat. Demgegenüber war die Invasionszone der Tumorproben in 20 von 28 Fällen durch eine mittlere PAR-1-Expression gekennzeichnet. Hierbei exprimierte die Invasionszone signifikant weniger PAR-1 als die Tumorzone, jedoch deutlich mehr als die graue und weiße Substanz des Referenzgewebes.

Durch die aufgeführten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine stufenweise Abnahme der PAR-1-Expression von der Tumorzone der Glioblastomproben ausgehend über die Invasionszone und graue Substanz bis hin zur weißen Substanz der tumorfreen Vergleichsproben beobachtet werden konnte. Daher kann man die Vermutung anstellen, dass die Zunahme des Protease-aktivierten-Rezeptors-1 durch Thrombin im entsprechenden Gewebe eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression spielt.

Auch bei der PAR-1-Expressionsanalyse von ein- und mehrschichtigen Gefäßen in den untersuchten Geweben, waren ähnliche Tendenzen wie in der Bewertung von PAR-1 im entsprechenden umliegenden Gewebe zu verzeichnen. Das Endothel der Blutgefäße in der grauen Substanz wies eine niedrige bis negative PAR-1-Expression auf. Wohingegen die Blutgefäße der weißen Substanz des Referenzgewebes eher durch eine vollständige PAR-1-Negativierung gekennzeichnet war. In der Gesamtheit betrachtet waren diese Expressionsunterschiede von PAR-1 zwischen den Referenzproben im Großteil der Fälle nicht signifikant.

Die in der Tumorzone befindlichen Blutgefäße exprimierten den signifikant höchsten Anteil von PAR-1 in Bezug auf die Invasionszone beziehungsweise auf die graue und weiße Substanz der Referenzproben. In der Invasionszone war die PAR-1-Expression in den Endothel der Blutgefäße signifikant niedriger als in der Tumorzone der Tumorproben, jedoch signifikant höher als in der grauen und weißen Substanz.

Auch hier war eine stufenweise Abnahme der PAR-1-Immunreaktivität in den Endothelien der Blutgefäße, von der Tumorzone ausgehend über die Invasionszone bis zum Referenzgewebe, zu sehen.

In der biomedizinischen Fachliteratur ist über die PAR-1-Expression in Gliomen und speziell in Glioblastomen bisher nur wenig bekannt. Auch hier wurde wie bereits schon erwähnt nicht zwischen Tumor- und Invasionszone unterschieden, sodass wiederum bei der Beschreibung in den Studien vom Tumorzentrum ausgegangen werden muss.

Erstmalig wurde über die Expression von PAR-1 in Gliomzellen WHO-Grad IV in der Immunfluoreszenzstudie von Kaufmann et al. berichtet. Die Arbeitsgruppe gewann primäre Glioblastomzellkulturen von einem 64-jährigen Mann und von einer 50-jährigen Frau operativ und detektierte diese mit einem Antikörper gegen den Thrombinrezeptor PAR-1. Sie konnte zum ersten Mal den Beweis antreten, dass in Glioblastomen eine erhöhte PAR-1-Expression auftritt (Kaufmann et al. 1998).

In einer weiteren Arbeit von Okamoto et al. konnte in der RT-PCR-Analyse von A172 menschlichen Glioblastomzellen ein weiterer Nachweis der PAR-1-Expression aufgezeigt werden. Weiterhin vollzog man die Anregung des Rezeptors mit einem spezifischen Agonisten, wodurch es zur erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Anreicherung kam und entsprechende Einflüsse auf die Zellproliferation im Rahmen von adaptiven Veränderungen im ZNS auftraten (Okamoto et al. 2001).

Auch die Arbeitsgruppe von Ubl et al. wies in ihrer RT-PCR und Ca^{2+} -Imaging-Studie in C6-Gliomzellen von Ratten eine erhöhte Expression von PAR-1 nach (Ubl et al. 1998).

Junge et al. zeigten, dass eine übermäßige PAR-1-Expression in den Astrozyten von grauer und weißer Substanz auftrat, sowie eine mäßige Immunreaktivität in den Neuronen der grauen Substanz. Allerdings war die Expression von PAR-1 in der weißen Substanz insgesamt geringer ausgebildet als in der grauen Substanz. Ursächlich für diesen Expressionsunterschied zwischen grauer und weißer Substanz ist wahrscheinlich auf der einen Seite das Fehlen der neuronalen Zellkörper in der weißen Substanz. Andererseits existiert dadurch eine hohe Dichte von neuronalen Prozessen in der grauen Substanz, welche in der weißen Substanz aufgrund des anatomischen Aufbau des Gehirns nicht vorhanden sind. Weiterhin veranschaulichte die Studie von Junge et al. bei der Ca^{2+} -Imaging-Analyse an U178MG-Glioblastomzellen, dass die PAR-1-Expression in den Tumorzellen von Glioblastomen sehr stark hochreguliert ist. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit. Interessanterweise wies das Kapillarendothel der grauen Substanz in der Arbeit von Junge et al. eine in ganz geringem Maße ausgeprägte PAR-1-Expression auf. Eine Aussage über die Immunreaktivität von PAR-1 im

Gefäßendothel von weißer Substanz beziehungsweise im Tumorgewebe von Glioblastomen wurde hier nicht getroffen (Junge et al. 2004).

In der RT-PCR-Analyse von Bartha et al. gelang erstmalig der Nachweis einer erhöhten PAR-1-Konzentration in den kapillaren Endothelzellen des Rattenhirns (Bartha et al. 2000).

Die Arbeitsgruppe um O'Brien et al. wies hingegen in menschlichen Nabelschnurendothelzellen ebenfalls einen hohen Gehalt von PAR-1 nach (O'Brien et al. 2000).

Ein Vergleich der PAR-1-Expression von Blutgefäßen der grauen und der weißen Substanz ist in der biomedizinischen Fachliteratur noch nicht beschrieben worden. Weiterhin existieren bisher keine Ergebnisse über die Expressionsunterschiede von PAR-1 in ein- und mehrschichtigen Blutgefäßen von Tumor- und Invasionszone.

6.6 Tumorbiologische Bedeutung der untersuchten Antigene

Zunächst einmal muss man feststellen, dass es sich bei NCAM-140 und bei CD 31 um Adhäsionsmoleküle handelt, die auf Zelloberflächen aufzufinden sind (Soroka et al. 2008, Newman 1997). Hingegen ist PAR-1 ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der die zelluläre Antwort der extrazellulär gelegenen Serinprotease Thrombin reguliert (Luo et al. 2007).

Es stellte sich die Frage, welche Auswirkung die Veränderungen von NCAM-140-, PAR-1- und CD 31-Expression auf Glioblastome haben.

Zu den wichtigsten Faktoren der Tumورprogression zählt unter anderem das Wachstum, die Invasion des Tumors in das peritumorale Hirngewebe und die Angiogenese.

In der hier vorliegenden Arbeit war in der deutlich proliferativen Tumorzona, eine fehlende oder sehr geringe NCAM-140-Expression zu beobachten. Dagegen war die Expression von NCAM-140 in der deutlich geringen zellproliferativen Invasionszone signifikant höher. Daher lässt sich die Vermutung anstellen, dass es einen reziproken Zusammenhang zwischen Proliferation von Zellen und NCAM-140-Expression gibt. Eine Bestätigung hierfür ist in den Arbeiten von Sporns et al. und Krushel et al., bei den Untersuchungen an Astrozyten zu finden (Sporns et al. 1995, Krushel et al. 1995). Auch die Ergebnisse an Gliomen von Hung et al. zeigten, dass mit steigendem Proliferationspotenzial die NCAM-Expression abnimmt (Huang et al. 2001). Dabei stellt sich die Frage, wie die Zellproliferation und NCAM-140-Expression miteinander verknüpft sind. In diesem Zusammenhang kommt den Matrixmetalloproteinasen eine wichtige Rolle zu. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass während der Proliferationsphase von Gliomzellen zwar die NCAM-Expression herunterreguliert ist, jedoch Matrixmetalloproteinasen im deutlichen Maße ansteigen (Gratsa et al. 1997, Nakagawa et al. 1996). Auch Tews und Nissen bewiesen, dass mit steigender Proliferation es zu einer Erhöhung der proteolytischen Enzyme wie MMP-2 und MMP-9 kommt. Letztendlich bewirken diese Matrixmetalloproteinasen die

Auflösung der Matrix und durch den Verlust der Zelladhäsionskräfte, wie sie durch NCAM-140 realisiert wird, ist es den Gliomzellen erlaubt, in das umliegende Gewebe vorzudringen (Tews und Nissen 1998, Gratsa et al. 1997). Diese Ergebnisse unterstützen im Resultat die Behauptung, dass NCAM-140 nicht nur eine entscheidende Rolle in Prozessen der Zelladhäsion spielt, sondern auch eine entscheidende Funktion in der Wachstumsregulation hat.

Eine erhöhte Expression von PAR-1 wurde in der vorliegenden Arbeit eher in den Geweben mit einer verstärkten Proliferation beobachtet. Wohingegen in weniger proliferativem Gewebe eine verminderte PAR-1-Expression detektiert werden konnte. Daher scheint auch PAR-1, eine entscheidende Rolle in der Tumorphiliferation zu spielen. In verschiedenen Studien der biomedizinischen Fachliteratur konnte daher bewiesen werden, dass die Proliferation von Astrozyten durch die Thrombin/PAR-1-Verbindung wesentlich beeinflusst wird (Wang et al. 2002b, Wang et al. 2002a). Durch die Aktivierung von PAR-1 kommt es zur Bildung einer Mitogen-aktivierenden Kinase (MAPK), die es wiederum den Astrozyten erlaubt, zu proliferieren (Wang et al. 2002b). Da die Astrozyten zu den Gliazellen gehören, aus denen sich durch pathologische morphologische Veränderungen die neoplastischen Zellen von Gliomen entwickeln, lässt sich vermuten, dass ähnliche Mechanismen bei der Proliferation von Glioblastomen greifen wie bei Astrozyten. Allerdings konnte in der Studie von Okamoto et al. bei der Aktivierung von PAR-1 in A172 menschlichen Glioblastomzelllinien kein Effekt auf die Zellproliferation nachgewiesen werden. Jedoch kann die Aktivierung der PARs durch unterschiedliche Agonisten eine unterschiedliche Reaktion hervorrufen, sodass die Vermutung angestellt werden kann, dass die Wirkung des, in der Arbeit von Okamoto et al., verwendeten Agonisten SFLLRN möglicherweise nicht der von Thrombin in Bezug auf die Proliferation der Glioblastomzellen entspricht (Okamoto et al. 2001). Auf der anderen Seite war in den Untersuchungen bei Bartha et al. eine vielfach höhere Konzentration von SFLLRN nötig, um gleiche Reaktionseffekte wie bei einem weitaus geringeren Thrombingehalt zu erzielen (Bartha et al. 2000).

Hayakawa et al. zeigten in ihrer Studie an A172 menschlichen Glioblastomzellen, dass Thrombin sehr wohl einen bedeutenden Einfluss auf Tumorzellproliferation hat. Es kommt dabei zur erhöhten PDGF-AB-Sekretion (platelet-derived growth factor-AB), die im Resultat die Zellproliferation beeinflusst. Allerdings konnte hier kein Nachweis erbracht werden, dass diese erhöhten Konzentrationen von PDGF-AB durch den Thrombin/PAR-1 proteolytischen Mechanismus vermittelt wird. Aufgrund dessen könnte die Vermutung naheliegen, dass die durch Thrombin induzierte Proliferation von Glioblastomzellen nicht durch PAR-1 vermittelt wird, sondern ein anderer bisher noch ungeklärter Zellmechanismus verantwortlich ist. Daher wird es die Aufgabe weiterer Forschungen sein, zu klären, ob Thrombin/PAR-1-vermittelte

Mechanismen wirklich keinen Einfluss auf die proliferativen Vorgänge in Gliomen und somit auf Glioblastomen haben (Hayakawa et al. 2007).

Das Tumorwachstum ist nicht nur allein von der Proliferation der Tumorzellen abhängig, sondern auch von der Proliferation der Gefäße, was die Prozesse der Angiogenese umfasst. In der hier vorliegenden Arbeit war die höchste Gefäßdichte und damit verbunden die höchste Gefäßproliferation, in dem Gewebe mit der stärksten proliferativen Aktivität aufzufinden.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Ausmaß der Tumorprogression von der Neovaskularisation abhängig ist (Folkman 1995, Rak et al. 1995). Dabei stellt die Angiogenese nicht nur ein histologisches Bewertungskriterium dar, sondern ist selbst ein Prognosekriterium (Lebelt et al. 2008). Wie bereits unter 2.2 beschrieben ist die Zellhypoxie, wie sie bei zellulären proliferativen Vorgängen zwangsläufig entsteht, ein bedeutender Indikator für die Gefäßneubildung. Dabei werden eine Reihe von Wachstumsfaktoren mit ihren entsprechenden Rezeptoren hochreguliert (Kleihues und Cavenee 2000, Dreys 2005). Dem endothelialen Gefäßwachstumsfaktor (VEGF) kommt dabei eine Hauptrolle zu. Die Expressionsanalyse des VEGF-Rezeptors-3 von Grau et al. zeigte eine positive Korrelation in den untersuchten Gliomen, denn mit zunehmenden Malignitätsgrad war auch eine verstärkte VEGF-Rezeptor-3-Expression vorhanden und damit die Gefäßproliferation erhöht (Grau et al. 2007). Aber auch andere Moleküle wie das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, was zum einem in Glioblastomen verstärkt vorzufinden ist und zum anderen ein entscheidender heterophiler Bindungspartner zu CD 31 darstellt, ist am Prozess der Angiogenese wesentlich beteiligt (Aroca et al. 1999, Schnell et al. 2008). Die in ruhenden Gefäßen vorherrschende CD 31/CD 31-homophile Verbindung, die die Adhäsionskräfte zwischen Zelle-Zelle und Zelle-Matrix beeinflusst und stabilisiert, wird bei der Tumorangio-genese gestört. Es kommt zur Bindung von CD 31 an einen heterophilen Partner (z. B. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin), wodurch diese heterophile Wechselwirkung zur Proliferation von Gefäßen aus dem benachbarten tumorfreien beziehungsweise tumorarmen Gewebe führt. Folglich wird die Angiogenese im Tumorgewebe begünstigt und erklärt die erhöhte Gefäßdichte und -proliferation der Tumorzone. Aroca zeigt in seiner CD 31-Expressionsanalyse an Gliomen, dass vor allem in Glioblastomen die Gefäßproliferation in den Endothelzellen erhöht ist (Aroca et al. 1999). In einer anderen Studie von Lebelt et al., die ebenfalls Gliome unterschiedlichen WHO-Grades untersuchte, war die höchste proliferative Tätigkeit in endothelialen Zellen von Glioblastomen gefunden worden. Auch hier konnte eine positive Korrelation formuliert werden, dass mit zunehmenden Malignitätsgrad eine verstärkte endotheliale Zellproliferation vorhanden ist (Lebelt et al. 2008).

Die Neoangiogenese wird aber auch durch die Beteiligung von PAR-1 und deren aktivierender Serinprotease Thrombin sehr stark beeinflusst. Yin et al. wiesen bei der Untersuchung an SB-2-nicht-invasiven-Melanomzellen nach, dass eine erhöhte Aktivität von PAR-1 die Expression der VEGF-mRNA wesentlich beeinflusst. Im Resultat zeigte sich bei Zunahme der PAR-1-Expression auch eine induzierte erhöhte Konzentration des Vascular Endothelial Growth Factors, wodurch die Prozesse der Tumorangiogenese wesentlich beeinflusst werden. Auf der anderen Seite spielt die Anwesenheit von PAR-1 auch eine entscheidende Rolle bei der Stabilität der rekrutierten Gefäße (Yin et al. 2003a). Tsopanoglou und Maragoudakis zeigten in ihren Studien, dass Thrombin neben der Aktivierung von PAR-1 auch die Konzentration des mRNA-Spiegels für den VEGF-Rezeptor wesentlich beeinflusst. Da Angiogenese von den endothelialen Zell-Interaktionen mit extrazellulären Matrixproteinen (z. B. Integrine) abhängig ist, hat Thrombin auch hier wesentlichen Einfluss. Thrombin erhöht in den Endothelzellen die Konzentration von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, was als ein bedeutender Marker für die Neoangiogenese identifiziert wurde (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004).

Die Beeinflussung der Tumorangiogenese wird auch durch eine veränderte NCAM-Expression bestimmt. NCAM kann auch in diesem Rahmen die Zelladhäsionen im Wesentlichen modulieren und zur Gefäßneubildung beitragen (Bussolati et al. 2006, Crnic et al. 2004). Die dabei ablaufenden Mechanismen sind Bestandteil aktueller Forschungen.

Invasives Wachstum in das peritumorale Hirngewebe ist ein typisches Charakteristikum von Gliomen. Damit eine Tumorzelle invasiv wird, muss sie die extrazelluläre Barriere überwinden. Dabei läuft ein mehrstufiger Vorgang ab. Zunächst kommt es zur Anlagerung der invadierenden Tumorzelle an die extrazelluläre Matrix, nachfolgend entsteht durch Proteolyse ein Gewebedefekt, durch den die Invasion der infiltrierenden Zelle erfolgt (Liotta et al. 1982). Eine besonders bevorzugte Invasionsroute stellt dabei die Basalmembran von vaskulären Strukturen dar, in der den Tumorzellen eine effektive Anlagerung ermöglicht wird (Giese et al. 1998, Tonn und Goldbrunner 2003). Eine gesteigerte Migration und Motilität erfolgt unter anderem durch eine verminderte NCAM-Expression (Laws et al. 1993, Gratsa et al. 1997, Prag et al. 2002). Owens et al. beobachteten, dass bei einer gesteigerten Expression von NCAM-140 die Invasion behindert wird (Owens et al. 1998). Wird NCAM geringer beziehungsweise nicht auf Zellen exprimiert, wie es in der vorliegenden Arbeit für NCAM-140 in den Glioblastomproben gezeigt wurde, sind die interzellulären Adhäsionen vermindert und die Mobilität der Zellen erhöht (Edvardsen et al. 1994). In der Arbeit von Duenisch et al. konnte bei einigen von den Glioblastomen eine peritumorale Hirnsubstanz abgegrenzt werden. Dabei handelte es sich um

eine NCAM-140-positivere Invasionszone, die zum Teil eine scharfe Demarkierung zur deutlich NCAM-140-negativeren Tumorzone erkennen ließ (Duenisch et al. 2011). Dieses Phänomen ist konform zu den Ergebnissen in der hier vorliegenden Arbeit, wo auch oftmals eine relativ scharfe Abgrenzung zwischen der weitgehend NCAM-140 negativen Tumorzone und der deutlich NCAM-140-positiven Invasionszone zu erkennen war. Daher kann die Vermutung angestellt werden, dass eine erhöhte NCAM-140-Expression in der Invasionszone von Glioblastomen die Invasion einschränkt und somit eine Abgrenzung der Tumorzone zum peritumoralen Gewebe möglich ist.

PAR-1 kommt ebenfalls ein wesentlicher Anteil in der Tumordinvasion zu. Dies wurde in zahlreichen Studien an nicht intrakraniellen Tumoren nachgewiesen. So konnte die Arbeitsgruppe von Yin et al. bei Untersuchungen am duktalen Mamma-Ca zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen Invasion des Mamma-Ca und PAR-1-Expression besteht. Somit war ein hoher Grad der Metastasierung auch in den Zelllinien mit der stärksten PAR-1-Expression zu finden, wohingegen die Zellen mit einer moderaten PAR-1-Expression eher eine mäßige Metastasierung aufwiesen (Yin et al. 2003b). Fujimoto et al. wiesen bei Untersuchungen an Magen-Ca-Zellen nach, dass durch die Zunahme der PAR-1-Aktivität eine entsprechend erhöhte Invasion beziehungsweise Proliferation der Tumorzellen auftritt (Fujimoto et al. 2010). In der hier vorliegenden Arbeit ist die höchste PAR-1-Expression in der Tumorzone von Glioblastomen zu finden, womit die höchste tumorprogressive Kraft beziehungsweise das stärkste invasive Potenzial existiert. Bestätigung finden diese Resultate in den Ergebnissen von Balzarotti et al., die den Einfluss von niedermolekularen Heparin auf das Zellwachstum und die Invasion von höhergradigen Gliomen untersuchten. Glioblastome wiesen dabei die stärkste PAR-1-Expression mit der höchsten Proliferations- und Invasionsrate auf (Balzarotti et al. 2006).

Eine Invasionssteigerung durch CD 31, dessen verstärktes Vorkommen in Glioblastomen in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist eher in indirekter Weise denkbar. Zum einen ist eine Tumordinvasion ohne Beteiligung der Neoangiogenese nicht möglich. CD 31 spielt wie bereits erwähnt bei der Tumorangiogenese eine entscheidende Rolle (Aroca et al. 1999, Lebelt et al. 2008). Auf der anderen Seite sind Integrine bedeutende heterophile Bindungspartner zu CD 31 (Aroca et al. 1999, Newman 1997). Integrine haben einen nachgewiesenen Einfluss, auf die Zellmigration regulierend einzuwirken. Damit kommt ihnen ein potenzielles Mitwirken bei der Invasion von Gliomen zu (D'Abaco und Kaye 2007).

6.7 Wirkungen der untersuchten Antigene auf andere neuronale und pathophysiologische Prozesse

Das Neurale Zelladhäsionsmolekül hat neben den bereits dargelegten Zusammenhängen der NCAM-Expression in Glioblastomen noch einen sehr starken Einfluss auf viele neuronale Funktionen. So spielt es zum Beispiel auch bei neurologischen Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Schizophrenie eine bedeutende Rolle.

Bei Chorea Huntington liegt pathologisch-anatomisch ein selektiver Untergang der GABAergen im Nucleus caudatus und Putamen (Striatum) zugrunde. Die Kerngebiete, die striatale Projektionen erhalten - insbesondere Globus pallidus und Pars reticulata der Substantia nigra - sind ebenfalls betroffen. Es kommt mit zunehmender Krankheitsdauer zur Atrophie von Thalamus und Kortex, was durch die Fehlinhibition dieser Gebiete begründet ist (Masuhr und Neumann 2005). Die Betroffenen leiden unter schweren hyperkinetischen Bewegungsstörungen und Defiziten in den kognitiven Funktionen. Van der Borght und Brundin zeigten, dass es hier im Hippocampus und piriformen Kortex zu einem erheblichen Verlust von PSA-NCAM kommt. Aufgrund des damit verminderten Zell-Zell-Kontakts und der nachlassenden Zellstabilität kommt es auf der einen Seite zum Neuronenverlust und auf der anderen Seite zu Störungen in der Impulsweiterleitung, was unter anderem die Symptome der Huntington-Krankheit begründet (van der Borght und Brundin 2007).

Die Schizophrenie ist eine psychische Erkrankung und gehört zu den endogenen Psychosen. Es kommt psychopathologisch zu beschreibbaren Auffälligkeiten des Denkens, der Wahrnehmung und der Affektivität (Arolt et al. 2004). In der Studie von Sullivan et al. konnte ein Gen identifiziert werden, welches im präfrontalen Kortex und Hippocampus unterschiedlich stark exprimiert wird. Dieses Gen kann über den Tyrosinkinaserzeptor die NCAM-Expression steuern, was wiederum Einfluss auf die Erkrankung nimmt (Sullivan et al. 2007).

Auch PAR-1 ist außerhalb vom malignen Prozess an weitreichenden pathophysiologischen Prozessen im Gehirn beteiligt. Es hat auf eine Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Parkinsonerkrankung und dem Alzheimer einen erheblichen Einfluss.

Der Morbus Parkinson ist eine Erkrankung des Gehirns, die durch Brady- bis Akinesie, Tremor, Rigor, Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta, Auftreten von Lewy-Körperchen und Dopaminverlust im Striatum gekennzeichnet ist. Obwohl es auch genetische Komponenten für die Krankheitsentstehung gibt, ist der größte Teil jedoch idiopathischer Natur (Olanow und Tatton 1999). Es konnte in der Arbeit von Hamill et al. gezeigt werden, dass verstärkt PAR-1 in Astrozyten sowie in Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen der Substantia nigra pars compacta exprimiert wird. Die Aktivierung des Rezeptors in

dieser Hirnregion verursacht im Resultat einen vermehrten Verlust von Dopamin, Dopamin-Transportern und Tyrosinhydroxylase sowie die Entstehung von Mikroglia. Die Gesamtheit dieser Mechanismen bedingt die Entstehung beziehungsweise die Symptome der Parkinsonerkrankung (Hamill et al. 2007).

Die senile Demenz vom Alzheimer-Typ ist eine multifaktorielle Erkrankung. Hier kommt es zu fortschreitender Hirnatrophie, pathologischen Fibrillenveränderungen und senilen Plaques. Die alterskorrelierte Krankheit manifestiert sich meist jenseits des 65. Lebensjahrs mit langsam progredienten Gedächtnis-, Aufmerksamkeits- und Orientierungsstörungen. Außer neurophysiologischen Symptomen fehlen neurologische Ausfälle. Die Vigilanz ist intakt. Es kommen gravierende Einschränkungen und Beeinträchtigungen des Alltagslebens hinzu (Masuhr und Neumann 2005). Die Studie von Suo et al. wies nach, dass PAR-1 in Verbindung mit Thrombin eine schnelle Tau-Proteinhyperphosphorylierung und Aggregation in Neuronen des Hippocampus erzeugt, was zur Pathogenese der Alzheimerkrankheit wesentlich beiträgt (Suo et al. 2003).

CD 31 wird nicht nur auf der Zelloberfläche von Endothelzellen gebildet, sondern auch auf Zellen des hämatopoetischen und immunologischen Systems, wie Thrombozyten, Neutrophile, Monozyten, natürliche Killerzellen und T-Zellen. Somit hat CD 31 einen großen Einfluss auf vielseitige akute und chronische Entzündungsprozesse, wie z. B. Multiple Sklerose (MS) und rheumatoide Arthritis. Ebenfalls konnten Zusammenhänge zu ischämisch bedingten Erkrankungen, wie den Herzinfarkt und Apoplex umfasst, aufgezeigt werden. Auch die Arteriosklerose - welche eine chronisch entzündliche Krankheit der großen Arterien ist, bei der pathogenetisch eine komplizierte Wechselwirkung zwischen Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Monozyteninfiltraten und Leukozyten stattfindet - wird durch CD 31 beeinflusst. Wie im Detail die zellulären Mechanismen in den Prozessen zusammenwirken, ist noch Bestandteil aktueller Forschungen (Woodfin et al. 2007, Kalinowska und Losy 2006).

6.8 Therapeutische Ansätze und Ausblicke bei den untersuchten Antigenen

Gliome sind die häufigsten Gehirntumore und die derzeitigen Therapieformen (Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie) haben insgesamt betrachtet eine limitierende Wirksamkeit. In den letzten 25 bis 30 Jahren hat es in Bezug auf die mittlere Überlebensrate nur wenige Verbesserungen bei vor allem höhergradigen Gliomen gegeben. Die mögliche Ursache für diesen Misserfolg liegt in der komplizierten Biologie der Tumore begründet. Hierbei spielen nicht nur zelluläre und molekulare Mechanismen eine Rolle, sondern auch Wechselwirkungen der Tumorzelle mit der Umgebung. Mehr als 80 % der selbst aggressiven Behandlungen scheitern

wegen der eingeschränkten lokalen Kontrolle des Tumors (D'Abaco und Kaye 2007). Daher gibt es in den letzten Jahren verschiedenste neue Therapieansätze, die auf die Mechanismen der in dieser Arbeit untersuchten Antigene abzielen.

Um die Tumorprogression zu minimieren, spielt die Beeinflussung der Angiogenese eine wesentliche Rolle.

Bevacizumab (Avastin[®]) ist ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF und seit längerem bei der Behandlung von einem fortgeschrittenem nicht kleinzelligen Lungen-Ca sowie bei einem fortgeschrittenem Mamma-Ca und Colon-Ca ein etablierter Therapieansatz zur Verbesserung der mittleren Überlebensrate im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie. Seit Mai 2009 erhielt Bevacizumab auf Grundlage der Phase-II-Studie die Zulassung bei der Behandlung von rezidivierenden höhergradigen Gliomen. Eine Abschätzung der Langzeiterfolge, bleibt aufgrund der derzeit fehlenden Datenlage noch abzuwarten (Verhoeff et al. 2009, Norden et al. 2009).

Aber auch andere antiangiogene therapeutische Ansätze, die sich im Moment noch zum Teil in experimentellen Phasen befinden, könnten vielversprechende Möglichkeiten sein, um die Tumorprogression von Gliomen zu minimieren. Die Hemmung von PAR-1 steht dabei im zentralen Brennpunkt der heutigen Forschungen. Dabei war es die Bestrebung, Rezeptorantagonisten wie RWJ56110 und SCH79797 zu entwickeln. Die chemische Ausgestaltung von RWJ56110 brachte eine zweite Generation vom Molekül - RWJ58259 - hervor, welches weniger hämodynamische Nebenwirkungen zeigte. Die antiangiogene Wirkung von PAR-1-Antagonisten korreliert mit der hemmenden Wirkung auf die endotheliale Zellproliferation und DNA-Synthese. Die Hemmung von PAR-1 in Endothelzellen führt zur Restriktion von Zellwachstum und Induktion der Apoptose (Tsopanoglou und Maragoudakis 2007). Eine andere Studie von Chackalamannil et al. berichtet über die Entwicklung eines aktiven oralen PAR-1-Antagonisten auf der Grundlage des Naturproduktes Himbicine, welches ein Alkaloid ist, das aus der Rinde von australischen Magnolien isoliert und gewonnen wird (Chackalamannil et al. 2005). Die Evaluierung der Sicherheit und Wirksamkeit dieser neuen Substanz ist derzeit Bestandteil von klinischen Phase-II- und III-Studien. Auf der anderen Seite gibt es auch Ansätze, die G-Protein-Rezeptorsignalisierung auf der Zellinnenseite von PAR-1 zu modulieren und inhibieren. Dabei werden zellpenetrierende Pepducine eingesetzt, die die lipidierten Fragmente von intrazellulären G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Schleifen nutzen, um gezielt in den Signalweg der Zelle einzugreifen (Tsopanoglou und Maragoudakis 2007). Zania et al. berichteten kürzlich, dass bei der proteolytischen Aktivierung am N-terminalen Ende des PAR-1-Rezeptors ein 41 Aminosäure langes Peptidspaltprodukt mit der Bezeichnung Parstatin entsteht, was durch Zellpenetration zur intrazellulären Anreicherung führt und in der

Konsequenz die Zellproliferation hemmt, Apoptose induziert und somit die Angiogenese hemmt. Daher liegt das Bestreben in der künstlichen Herstellung von diesem Peptidsplaltprodukt und dem Versuch der intravenösen Injektion. Obwohl Parstatin attraktive pharmakologische Eigenschaften besitzt, bleibt im Moment die Frage der physiologischen Rolle in vivo unbeantwortet und wird Bestandteil zukünftiger Forschung sein (Zania et al. 2009).

CD 31 ist ein weiteres wichtiges Molekül, wenn es um Hemmung der Tumorangiogenese geht. So zeigten Zhou et al. im Mausmodell, dass die Hemmung von CD 31 mit einem Antikörper zur wesentlichen Rekrutierung der Gefäßneubildung bei Tumorerkrankungen beiträgt (Zhou et al. 1999). Auch die Arbeitsgruppe von Cao et al. wies im Mausmodell ähnliche Ergebnisse bezüglich der Hemmung von Angiogenese durch einen Antikörper gegen CD 31 nach, wie die Untersuchungen um Zhou et al. Weiterhin veranschaulichten sie, dass durch die Hemmung von CD 31 auch Zellmigration und -wachstum wesentlich gemindert wird (Cao et al. 2009).

Die Beeinflussung von Zellwachstum und Invasion ist ein weiterer wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt. So zeigten Balzarotti et al. bei der Untersuchung an höhergradigen Gliomen, dass niedermolekulare Heparine wie Enoxaparin neben der Vorbeugung und Behandlung von venösen Thromboembolien auch eine antineoplastische Wirkung besitzen und somit eine direkte Wirkung auf das Wachstum von Tumorzellen bei höhergradigen Gliomen haben (Balzarotti et al. 2006).

Neben den pharmakologischen therapeutischen Aspekten zur Minimierung der Tumorprogression ist es möglich, dass das untersuchte Antigen NCAM-140 als Detektormolekül für eine Tumorgrenze Verwendung findet. In den Untersuchungen von Duenisch et al. konnte die Abgrenzung einer zum Teil scharfen Tumorgrenze bei NCAM-140-negativen Glioblastomen zum peritumoralen Gehirngewebe vollzogen werden. Daher ist es denkbar, dass NCAM-140 zum einen als Markermolekül für die Identifizierung einer Tumorgrenze angewendet wird (Duenisch et al. 2011). Auf der anderen Seite könnte NCAM-140 eine intraoperative Nutzung haben, die zumindest als grobe Orientierung zur Definierung einer ausreichenden Tumorrandzone dient.

7. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsunterschiede von NCAM-140, CD 31 und PAR-1 in der Tumor- und Invasionszone humaner Glioblastome untersucht und miteinander verglichen. Weiterhin wurden diese Resultate dem tumorfreien Hirngewebe gegenübergestellt. In vielerlei Hinsicht konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede in der zellulären und molekularen Ausstattung von Tumor- und Invasionszone gibt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die untersuchten Antigene an der Abgrenzbarkeit des Tumors zum peritumoralen Gehirngewebe wesentlich beteiligt sind.

Bei der Expressionsanalyse von NCAM-140 konnte veranschaulicht werden, dass der überwiegend NCAM-140-negativen Tumorzone eine NCAM-140-positivere Invasionszone gegenüberstand. Daher war es möglich, lichtmikroskopisch eine zum Teil scharfe Tumorgrenze zwischen Tumor- und Invasionszone abzugrenzen. Diese beschriebenen Expressionsunterschiede zwischen beiden Zonen waren bei der makroskopischen Bewertung ähnlich der der lichtmikroskopischen Analyse ausgefallen. Daher kann die makroskopische Begutachtung von NCAM-140 zumindest als eine grobe Orientierung bei der Unterscheidung von Tumorzone und Invasionszone dienen und eine bedingte Aussage über die Tumorausbreitung geben. Unter Umständen ist es möglich, dass NCAM-140 als ein Markermolekül für die Detektion einer Tumorgrenze Einzug in die Wissenschaft findet.

Eine Erklärung für die Frage des Expressionsunterschiedes zwischen Tumor- und Invasionszone könnte sein, dass die Tumorzellen in der Invasionszone deutlich geringer ausgebildet sind und damit auch der Anteil an neoplastisch veränderten Zellen in der Tumorzone höher ist als in der Invasionszone. Dies wäre ein Beleg dafür, dass der Tumor zum einen in die Peripherie penetriert und zum anderen damit vom peritumoralen Hirngewebe abgrenzbar ist. Daher ist anzunehmen, dass die Expression von PAR-1 durch Tumorzellen erfolgt. Im Resultat müsste bei alleiniger Betrachtung der Zellzusammensetzung, ein signifikanter Unterschied bei der Expressionsanalyse von PAR-1 zwischen Tumor- und Invasionszone festzustellen sein. In der Tat ist dieser Sachverhalt, in der hier vorliegenden Arbeit vorzufinden. Die Beeinflussung der Tumorprogression ist im Rückschluss plausibel.

Die Tumorprogression ist aber im Wesentlichen auch von der Neoangiogenese abhängig. Da CD 31 ein Markermolekül für Endothelzellen darstellt, müsste die Überlegung hinsichtlich der Expression von CD 31 bei Betrachtung von Tumor- und Invasionszone einen Überschuss in der Tumorzone ergeben. Diese signifikanten Unterschiede konnten in der vorliegenden Arbeit bei Betrachtung der beiden Zonen erzielt werden. Auch PAR-1 ist an angiogenen Prozessen wesentlich beteiligt. Bei der Analyse der PAR-1-Expression in den Endothelschichten konnten

sich gleiche Tendenzen wie bei CD 31 aus den theoretischen Überlegung abzeichnen. Auch hier war die PAR-1-Immunreaktivität in den Gefäßen der Tumorzone höher als in der Invasionszone. Zukünftigen Forschungen sollte die Analyse von weiteren Proteinen und Eigenschaften der Tumor- und Invasionszone umfassen, um in der Konsequenz die Tumorbilogie von Gliomen und insbesondere von Glioblastomen besser verstehen zu können und damit revolutionäre therapeutische Erfolge zu erreichen.

8. Literaturverzeichnis

- Amoureux MC, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. 2000. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci*, 20 (10):3631-3640.
- Arenberg DA, Strieter RM. 1999. Angiogenesis. In: *Molecular and cellular basis of inflammation*, Serhan CN, Ward PA. Aufl. Totowa, New Jersey: Human Press Inc.
- Aroca F, Renaud W, Bartoli C, Bouvier-Labit C, Figarella-Branger D. 1999. Expression of PECAM-1/CD31 isoforms in human brain gliomas. *J Neurooncol*, 43 (1):19-25.
- Arolt V, Dilling H, Reimer C. 2004. Basiswissen Psychiatrie und Psychotherapie. 5te Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Balzarotti M, Fontana F, Marras C, Boiardi A, Croci D, Ciusani E, Salmaggi A. 2006. In vitro study of low molecular weight heparin effect on cell growth and cell invasion in primary cell cultures of high-grade gliomas. *Oncol Res*, 16 (5):245-250.
- Bartha K, Domotor E, Lanza F, Adam-Vizi V, Machovich R. 2000. Identification of thrombin receptors in rat brain capillary endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20 (1):175-182.
- Brat DJ, Van Meir EG. 2004. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest*, 84 (4):397-405.
- Bussolati B, Grange C, Bruno S, Buttiglieri S, Deregibus MC, Tei L, Aime S, Camussi G. 2006. Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumor-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Exp Cell Res*, 312 (6):913-924.
- Cao G, Fehrenbach ML, Williams JT, Finklestein JM, Zhu JX, Delisser HM. 2009. Angiogenesis in platelet endothelial cell adhesion molecule-1-null mice. *Am J Pathol*, 175 (2):903-915.

- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407 (6801):249-257.
- Chackalamannil S, Xia Y, Greenlee WJ, Clasby M, Doller D, Tsai H, Asberom T, Czarniecki M, Ahn HS, Boykow G, Foster C, Agans-Fantuzzi J, Bryant M, Lau J, Chintala M. 2005. Discovery of potent orally active thrombin receptor (protease activated receptor 1) antagonists as novel antithrombotic agents. *J Med Chem*, 48 (19):5884-5887.
- Coughlin SR. 1994. Protease-activated receptors start a family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (20):9200-9202.
- Crnic I, Strittmatter K, Cavallaro U, Kopfstein L, Jussila L, Alitalo K, Christofori G. 2004. Loss of neural cell adhesion molecule induces tumor metastasis by up-regulating lymphangiogenesis. *Cancer Res*, 64 (23):8630-8638.
- Crossin KL, Krushel LA. 2000. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn*, 218 (2):260-279.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*, 236 (4803):799-806.
- D'Abaco GM, Kaye AH. 2007. Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci*, 14 (11):1041-1048.
- DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. 1997. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*, 151 (3):671-677.
- Dreys J. 2005. Tumorangiogenese-Grundlagen und therapeutische Ansätze. 1te Aufl. Bremen: Uni-Med.
- Duenisch P, Reichart R, Mueller U, Brodhun M, Bjerkvig R, Romeike B, Walter J, Herbold C, Regenbrecht CR, Kalff R, Kuhn SA. 2011. Neural cell adhesion molecule isoform 140

- declines with rise of WHO grade in human gliomas and serves as indicator for the invasion zone of multiform glioblastomas and brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137 (3):399-414.
- Dünisch P. 2009. Expressionsanalyse des neuralen Zelladhäsionsmoleküls Isoform 140 (NCAM-140) in humanen Gliomen im Vergleich zu anderen Hirntumoren und zu zerebralem Autopsiegewebe (Dissertation). Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Edvardsen K, Brunner N, Spang-Thomsen M, Walsh FS, Bock E. 1993. Migratory, invasive and metastatic capacity of NCAM transfected rat glioma cells. *Int J Dev Neurosci*, 11 (5):681-690.
- Edvardsen K, Pedersen PH, Bjerkvig R, Hermann GG, Zeuthen J, Laerum OD, Walsh FS, Bock E. 1994. Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *Int J Cancer*, 58 (1):116-122.
- Feiden S, Feiden W. 2008. [WHO classification of tumours of the CNS : Revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas.]. *Pathologe*, 29 (6):411-421.
- Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285 (21):1182-1186.
- Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1 (1):27-31.
- Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, Katayama K, Matsukawa S, Yamaguchi A. 2010. The activation of Proteinase-Activated Receptor-1 (PAR1) mediates gastric cancer cell proliferation and invasion. *BMC Cancer*, 10:443.
- Giese A, Laube B, Zapf S, Mangold U, Westphal M. 1998. Glioma cell adhesion and migration on human brain sections. *Anticancer Res*, 18 (4A):2435-2447.

- Gong N, Chatterjee S. 2003. Platelet endothelial cell adhesion molecule in cell signaling and thrombosis. *Mol Cell Biochem*, 253 (1-2):151-158.
- Gratsa A, Rooprai HK, Rogers JP, Martin KK, Pilkington GJ. 1997. Correlation of expression of NCAM and GD3 ganglioside to motile behaviour in neoplastic glia. *Anticancer Res*, 17 (6B):4111-4117.
- Grau SJ, Trillsch F, Herms J, Thon N, Nelson PJ, Tonn JC, Goldbrunner R. 2007. Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *J Neurooncol*, 82 (2):141-150.
- Greenberg M. 2006. *Handbook of Neurosurgery*. 6te Aufl. New York: Thieme
- Gumina RJ, Kirschbaum NE, Rao PN, vanTuinen P, Newman PJ. 1996. The human PECAM1 gene maps to 17q23. *Genomics*, 34 (2):229-232.
- Hamill CE, Caudle WM, Richardson JR, Yuan H, Pennell KD, Greene JG, Miller GW, Traynelis SF. 2007. Exacerbation of dopaminergic terminal damage in a mouse model of Parkinson's disease by the G-protein-coupled receptor protease-activated receptor 1. *Mol Pharmacol*, 72 (3):653-664.
- Hayakawa Y, Kurimoto M, Nagai S, Kurosaki K, Tsuboi Y, Hamada H, Hayashi N, Endo S. 2007. Thrombin-induced cell proliferation and platelet-derived growth factor-AB release from A172 human glioblastoma cells. *J Thromb Haemost*, 5 (11):2219-2226.
- Hollenberg MD, Compton SJ. 2002. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 54 (2):203-217.
- Huang CX, Hu SX, Chen B. 2001. [Expression of the neural cell adhesion molecule in human astrocytomas]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26 (6):543-545.
- Junge CE, Lee CJ, Hubbard KB, Zhang Z, Olson JJ, Hepler JR, Brat DJ, Traynelis SF. 2004. Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Exp Neurol*, 188 (1):94-103.

- Kalinowska A, Losy J. 2006. PECAM-1, a key player in neuroinflammation. *Eur J Neurol*, 13 (12):1284-1290.
- Kaufmann R, Patt S, Schafberg H, Kalff R, Neupert G, Nowak G. 1998. Functional thrombin receptor PAR1 in primary cultures of human glioblastoma cells. *Neuroreport*, 9 (4):709-712.
- Kellmann SM. 2010. Charakterisierung der Tumorzone und Invasionszone humaner Glioblastome (Dissertation). Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Khattab AZ, Ahmed MI, Fouad MA, Essa WA. 2009. Significance of p53 and CD31 in astroglomas. *Med Oncol*, 26 (1):86-92.
- Kirschbaum NE, Gumina RJ, Newman PJ. 1994. Organization of the gene for human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 shows alternatively spliced isoforms and a functionally complex cytoplasmic domain. *Blood*, 84 (12):4028-4037.
- Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E. 2005. Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J Neurochem*, 94 (5):1169-1179.
- Kleihues P, Cavenee WK. 2000. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System (WHO)*. 2te Aufl. Lyon, France: Lyon IRAC Press.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Orr EA, Savelieva E, Owens GC, Kruse CA. 1999. Paucity of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) nuclear immunostaining in gliomas and inability of retinoic acid to influence neural cell adhesion molecule (NCAM) expression. *J Neurooncol*, 41 (1):31-42.
- Koblitz J. 2004. Bedeutung des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls Isoform 140 (NCAM-140) für die Biologie humaner hirneigener Tumore (Diplomarbeit). Jena: Fachhochschule.
- Krushel LA, Sporns O, Cunningham BA, Crossin KL, Edelman GM. 1995. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits astrocyte proliferation after injury to different regions of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (10):4323-4327.

- Krushel LA, Tai MH, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. 1998. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (5):2592-2596.
- Laws ER, Jr., Goldberg WJ, Bernstein JJ. 1993. Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain: Scherer revisited. *Int J Dev Neurosci*, 11 (5):691-697.
- Lebelt A, Dzieciol J, Guzinska-Ustymowicz K, Lemancewicz D, Zimnoch L, Czykier E. 2008. Angiogenesis in gliomas. *Folia Histochem Cytobiol*, 46 (1):69-72.
- Liao F, Schenkel AR, Muller WA. 1999. Transgenic mice expressing different levels of soluble platelet/endothelial cell adhesion molecule-IgG display distinct inflammatory phenotypes. *J Immunol*, 163 (10):5640-5648.
- Liao F, Ali J, Greene T, Muller WA. 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 185 (7):1349-1357.
- Linnemann M, Kühl M. 2007. *Biochemie für Mediziner : Ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug*. 7te Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Liotta LA, Thorgeirsson UP, Garbisa S. 1982. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 1 (4):277-288.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114 (2):97-109.
- Lüllmann-Rauch R. 2006. *Taschenlehrbuch Histologie*. 2te Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Luo W, Wang Y, Reiser G. 2007. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev*, 56 (2):331-345.

- Mann KG. 1999. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost*, 82 (2):165-174.
- Masuhr KF, Neumann M. 2005. *Neurologie*. 5te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P. 1997. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol*, 158 (7):3408-3416.
- Moser M. 2008. [The role of thrombin in angiogenesis]. *Hamostaseologie*, 28 (4):189-194.
- Moser M, Patterson C. 2003. Thrombin and vascular development: a sticky subject. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (6):922-930.
- Moskopp D, Wassmann H. 2005. *Neurochirurgie:Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk*. 1te Aufl. Stuttgart: Schattauer GmbH.
- Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Fujimoto N, Okada Y. 1996. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase/type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. *J Neurooncol*, 28 (1):13-24.
- Newman PJ. 1997. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*, 99 (1):3-8.
- Newman PJ. 1999. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest*, 103 (1):5-9.
- Norden AD, Drappatz J, Wen PY. 2009. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol*, 5 (11):610-620.
- O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, Brass LF. 2000. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem*, 275 (18):13502-13509.

- Okamoto T, Nishibori M, Sawada K, Iwagaki H, Nakaya N, Jikuhara A, Tanaka N, Saeki K. 2001. The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma. *J Neural Transm*, 108 (2):125-140.
- Olanow CW, Tatton WG. 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 22:123-144.
- Owens GC, Edelman GM, Cunningham BA. 1987. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (1):294-298.
- Owens GC, Orr EA, DeMasters BK, Muschel RJ, Berens ME, Kruse CA. 1998. Overexpression of a transmembrane isoform of neural cell adhesion molecule alters the invasiveness of rat CNS-1 glioma. *Cancer Res*, 58 (9):2020-2028.
- Prag S, Lepekhin EA, Kolkova K, Hartmann-Petersen R, Kawa A, Walmod PS, Belman V, Gallagher HC, Berezin V, Bock E, Pedersen N. 2002. NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci*, 115 (Pt 2):283-292.
- Rak JW, St Croix BD, Kerbel RS. 1995. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs*, 6 (1):3-18.
- Reifenberger G, Blümcke I, Pietsch T, Paulus W. 2006. Pathology and classification of tumors of nervous system. IN: *Neuro-Onocology of CNS Tumors*, Tonn JC, Westphal M, Rutka JT, Grossman SA, Editors. 1te Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Riede UN, Werner M, Schaefer HE. 2004. Allgemeine und spezielle Pathologie. 5te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 2005. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res*, 65 (4):1406-1413.

- Ronn LC, Hartz BP, Bock E. 1998. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp Gerontol*, 33 (7-8):853-864.
- Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Preissner KT, Chavakis T, Santoso S. 2007. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem*, 282 (32):23603-23612.
- Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, Asou H, Inaba M, Otani M, Kawase T. 1998. Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer*, 82 (10):1921-1931.
- Schlegel U, Weller M, Westphal M. 2003. *Neuroonkologie*. 6te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Schmidt A. 1892. *Zur Blutlehre*. Aufl. Leipzig: Verlag von F. C. W. Vogel.
- Schnell O, Krebs B, Wagner E, Romagna A, Beer AJ, Grau SJ, Thon N, Goetz C, Kretzschmar HA, Tonn JC, Goldbrunner RH. 2008. Expression of integrin alphavbeta3 in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol*, 18 (3):378-386.
- Sokolova E, Reiser G. 2008. Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: localization, expression and participation in neurodegenerative diseases. *Thromb Haemost*, 100 (4):576-581.
- Soroka V, Kasper C, Poulsen FM. 2008. Structural Biology of NCAM. *Neurochem Res*,
- Soroka V, Kolkova K, Kastrup JS, Diederichs K, Breed J, Kiselyov VV, Poulsen FM, Larsen IK, Welte W, Berezin V, Bock E, Kasper C. 2003. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure*, 11 (10):1291-1301.

- Sporns O, Edelman GM, Crossin KL. 1995. The neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (2):542-546.
- Strigrow F, Riek-Burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-Noack P, Breder J, Krug M, Reymann KG, Reiser G. 2001. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci*, 14 (4):595-608.
- Sullivan PF, Keefe RS, Lange LA, Lange EM, Stroup TS, Lieberman J, Maness PF. 2007. NCAM1 and neurocognition in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 61 (7):902-910.
- Sun QH, Paddock C, Visentin GP, Zukowski MM, Muller WA, Newman PJ. 1998. Cell surface glycosaminoglycans do not serve as ligands for PECAM-1. PECAM-1 is not a heparin-binding protein. *J Biol Chem*, 273 (19):11483-11490.
- Suo Z, Wu M, Citron BA, Palazzo RE, Festoff BW. 2003. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J Biol Chem*, 278 (39):37681-37689.
- Swanson KR, Bridge C, Murray JD, Alvord EC, Jr. 2003. Virtual and real brain tumors: using mathematical modeling to quantify glioma growth and invasion. *J Neurol Sci*, 216 (1):1-10.
- Taveras JM, Thompson HG, Jr., Pool JL. 1962. Should we treat glioblastoma multiforme? A study of survival in 425 cases. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 87:473-479.
- Tews DS, Nissen A. 1998. Expression of adhesion factors and degrading proteins in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors. *Invasion Metastasis*, 18 (5-6):271-284.
- Thiery JP, Brackenbury R, Rutishauser U, Edelman GM. 1977. Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J Biol Chem*, 252 (19):6841-6845.

- Todaro L, Christiansen S, Varela M, Campodonico P, Pallotta MG, Lastiri J, Sacerdote de Lustig E, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L. 2007. Alteration of serum and tumoral neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in patients with brain tumors. *J Neurooncol*, 83 (2):135-144.
- Tonn JC, Goldbrunner R. 2003. Mechanisms of glioma cell invasion. *Acta Neurochir Suppl*, 88:163-167.
- Trepel M. 2008. *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. 4te Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. 2004. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost*, 30 (1):63-69.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. 2007. Inhibition of angiogenesis by small-molecule antagonists of protease-activated receptor-1. *Semin Thromb Hemost*, 33 (7):680-687.
- Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. 1993. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol*, 264 (5 Pt 1):C1302-1307.
- Ubl JJ, Vohringer C, Reiser G. 1998. Co-existence of two types of $[Ca^{2+}]_i$ -inducing protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-2) in rat astrocytes and C6 glioma cells. *Neuroscience*, 86 (2):597-609.
- van der Borgh K, Brundin P. 2007. Reduced expression of PSA-NCAM in the hippocampus and piriform cortex of the R6/1 and R6/2 mouse models of Huntington's disease. *Exp Neurol*, 204 (1):473-478.
- Verhoeff JJ, van Tellingen O, Claes A, Stalpers LJ, van Linde ME, Richel DJ, Leenders WP, van Furth WR. 2009. Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *BMC Cancer*, 9:444.

- Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, Bock E. 2004. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res*, 29 (11):2015-2035.
- Wang H, Ubl JJ, Reiser G. 2002a. Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia*, 37 (1):53-63.
- Wang H, Ubl JJ, Stricker R, Reiser G. 2002b. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283 (5):C1351-1364.
- Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. 2007. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (12):2514-2523.
- Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K. 2005. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endothelin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology*, 25 (3):201-206.
- Yin YJ, Salah Z, Maoz M, Ram SC, Ochayon S, Neufeld G, Katzav S, Bar-Shavit R. 2003a. Oncogenic transformation induces tumor angiogenesis: a role for PAR1 activation. *Faseb J*, 17 (2):163-174.
- Yin YJ, Salah Z, Grisaru-Granovsky S, Cohen I, Even-Ram SC, Maoz M, Uziely B, Peretz T, Bar-Shavit R. 2003b. Human protease-activated receptor 1 expression in malignant epithelia: a role in invasiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (6):940-944.
- Zania P, Gourni D, Aplin AC, Nicosia RF, Flordellis CS, Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE. 2009. Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 328 (2):378-389.
- Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, DeLisser HM. 1999. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis*, 3 (2):181-188.

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Brigitte Manuela Martin
Geburtsdaten: 30.10.1980 in Meerane/Sachsen

Schul Ausbildung

1987 - 1991 Erich-Weinert-Oberschule Glauchau
1991 - 1993 Lehngrundschule Glauchau
1993 - 1999 Georgius-Agricola-Gymnasium Glauchau,
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/02 - 12/08 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/04 Physikum

Famulatur

03/05 hausärztliche Praxis für Innere Medizin/Kardiologie (Jena)
02/06 - 03/06 Anästhesiologie und Intensivtherapie (Jena)
07/06 - 08/06 Gynäkologie und Geburtshilfe (Jena)
02/07 - 03/07 Neurochirurgie (Jena)

Praktisches Jahr

08/07 - 12/07 Innere Medizin und Geriatrie, Thüringen-Klinik
„Georgius Agricola“ Saalfeld-Rudolstadt gGmbH
12/07 - 03/08 Gynäkologie und Geburtshilfe, Sophien und Hufeland
Klinikum Weimar
03/08 - 07/08 Allgemein- und Visceralchirurgie, Sophien und Hufeland
Klinikum Weimar

berufliche Ausbildung

1999 - 2002 Ausbildung zur Krankenschwester an der Medizinischen
Berufsfachschule des Heinrich-Braun-Krankenhauses
Zwickau und dem Krankenhaus „Rudolf Virchow“
Glauchau gGmbH, Abschluss mit Erlaubnis zur
Führung der Berufsbezeichnung „Krankenschwester“
seit 02/09 Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe,
St. Georg Klinikum Eisenach gGmbH

9.2 Veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten

Publikation

Martin M, Brodhun M, Kratzsch T, Engelmann K, Katenkamp D, Träger U, Hanisch UK, Kuhn SA. 2012. Protease-activated receptor type 1 (PAR-1) is over-expressed in human glioblastoma multiforme WHO IV° in a location specific pattern as assisted by NCAM-140 glioblastoma border labeling. In Vorbereitung.

9.3 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. Kalff für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser Dissertation.

Ebenso danke ich besonders Frau PD Dr. med. S.A. Kuhn für ihre wissenschaftliche sowie fachkundige und tatkräftige Unterstützung. Weiterhin möchte ich mich bei ihr für ihre motivierende und vor allem geduldige Betreuung während des gesamten Zeitraumes der Promotion herzlich bedanken. Auch, dass sie mir wertvolle Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit gegeben hat, verdient meinen Dank.

Herrn Prof. Dr. med. D. Katenkamp und den Mitarbeitern des Pathologischen Institutes des Universitätsklinikums Jena danke ich für die Bereitstellung der technischen Geräte und Laboratorien sowie für die Bereitstellung der fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Frau C. Martin für die Unterstützung bei technischen und praktischen Fragestellungen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. M. Brodhun für die Unterstützung bei der Auswahl geeigneter Gewebeproben und für die Markierung von Tumor- und Invasionszone in den Glioblastomproben.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. med. R. Vollandt für die fachkundige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Statistik und in das SPSS-Programm.

An dieser Stelle danke ich meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern dafür, dass sie mich jahrelang auf meinem Weg unterstützt und begleitet haben.

Ebenso danke ich ganz herzlich Herrn A. Stoll für seine bedingungslose und geduldige Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion und darüber hinaus.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen Doktoranden des neuroonkologischen Forschungslabors der Neurochirurgischen Klinik für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. S.A. Kuhn, Dr. med. M. Brodhun, Dr. med. R. Vollandt und C. Martin,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.